

Proteinexpressionsanalyse und biochemische Funktionsanalyse von Hornerin und Trichohyalin-like1 in der Haut des Menschen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von

Ties Latendorf

Kiel 2015

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jens-Michael Schröder

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Leippe

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Nov. 2015

Zum Druck genehmigt: 27. Nov. 2015

gez. _____ Dekan/in

Probleme kann man niemals
mit derselben Denkweise lösen,
durch die sie entstanden sind.

Albert Einstein

Eines der Hauptprobleme wissenschaftlicher Forschung ist die Entwicklung von Fragestellungen, denn hier entscheidet sich, welche Modelle entwickelt und welche Fragen gestellt werden. Viele Forscher wenden sich wegen der rigorosen Beweislast wissenschaftlichen Arbeitens eher jenen Fragestellungen zu, die klare und präzise Antworten erwarten lassen, als solchen, die mit gängigen Grundannahmen im Konflikt stehen und ganz sicher Schwierigkeiten in der Beweisführung implizieren.

Michael Giesecke (Die Untersuchung institutioneller Kommunikation 1988)

Es waren weniger seine Beobachtungen und Experimente, die Galilei mit der Tradition brechen ließen, als vielmehr seine Einstellung ihnen gegenüber. Er behandelte die Ergebnisse seiner Beobachtungen und Experimente als Tatsachen, die unabhängig von einem vorgefassten Weltbild waren ... Die Tatsachen ließen sich nicht unbedingt in ein anerkanntes System des Universums einordnen, aber Galilei war der Meinung, dass von entscheidender Wichtigkeit sei, die Tatsachen hinzunehmen, um dann aus ihnen eine geeignete Theorie aufbauen zu können.

H.D. Anthony (Science and its Background 1948)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Die Haut | 1 |
| 1.1.1 Aufbau der Haut | 1 |
| 1.1.2 Funktionen der Haut | 2 |
| 1.1.2.1 Physikalische Barriere: Schutz vor UV-Strahlung und mechanischen Kräften | 3 |
| 1.1.2.2 Chemische Barriere: Schutz vor Austrocknung und Verlust bzw. Eintrag von Stoffen | 3 |
| 1.1.2.3 Biologische Barriere: Schutz vor Mikroorganismen | 4 |
| 1.1.2.4 Selbsterhaltung und Selbstreparatur | 4 |
| 1.1.2.5 Soziale, psychologische und sexuelle Funktionen | 5 |
| 1.1.3 Funktionen der Haut in Kooperation mit anderen Organen | 5 |
| 1.1.3.1 Sensorische Funktionen | 5 |
| 1.1.3.2 Kontrolle der Körpertemperatur | 6 |
| 1.1.3.3 Funktionen der Immunität | 7 |
| 1.2 Die Hautanhangsgebilde | 7 |
| 1.2.1 Nägel | 7 |
| 1.2.2 Schweißdrüsen | 8 |
| 1.2.3 Talgdrüsen | 10 |
| 1.2.4 Haare | 10 |
| 1.2.4.1 Haare und die Barriere | 15 |
| 1.3 Epidermale Differenzierung | 15 |
| 1.3.1 Der epidermale „cornified envelope“ | 18 |
| 1.3.2 Der epidermale Differenzierungskomplex (EDC) | 20 |
| 1.3.3 Die „S100 Fused Type“-Proteine (SFTPs) | 20 |
| 1.3.4 Die Immunabwehr der Haut des Menschen | 24 |
| 2 Fragestellung bzw. Zielsetzung der Arbeit | 27 |
| 3 Material | 28 |
| 3.1 Chemikalien | 28 |
| 3.2 Geräte | 28 |
| 3.3 Oligonukleotide | 30 |
| 3.4 Vektoren | 32 |
| 3.5 Antikörper | 32 |
| 3.6 Enzyme | 32 |
| 3.6.1 Polymerasen | 32 |
| 3.6.2 Restriktionsendonucleasen | 32 |
| 3.6.3 Ligasen | 33 |
| 3.6.4 Proteasen | 33 |
| 3.6.5 Transglutaminasen | 33 |
| 3.6.6 Protein-Arginin Deiminase | 33 |
| 3.7 Mikroorganismen und Zellkulturen | 33 |
| 3.7.1 <i>Escherichia coli</i> | 33 |
| 3.7.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 34 |
| 3.7.3 <i>Staphylococcus aureus</i> | 34 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.7.4 | <i>Bacillus megaterium</i> | 34 |
| 3.7.5 | <i>Candida albicans</i> | 34 |
| 3.7.6 | <i>Pichia pastoris</i> | 34 |
| 4 | Methoden | 35 |
| 4.1 | Verwendete Software | 35 |
| 4.2 | Bioinformatische Methoden | 35 |
| 4.3 | Molekularbiologische Methoden | 36 |
| 4.3.1 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 36 |
| 4.3.1.1 | Standard-PCR mit niedriger Fehlerrate | 37 |
| 4.3.1.2 | PCR zur Kontrolle von Bakterienkolonien | 38 |
| 4.3.1.3 | PCR zum Austausch von Basentriplets | 39 |
| 4.3.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 43 |
| 4.3.3 | Aufreinigung von PCR-Produkten | 43 |
| 4.3.4 | Restriktionshydrolyse | 44 |
| 4.3.5 | Ligation | 44 |
| 4.3.6 | Plasmidisolierung | 45 |
| 4.3.7 | Sequenzierung | 45 |
| 4.4 | Mikrobiologische Methoden | 46 |
| 4.4.1 | Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD600) | 46 |
| 4.4.2 | Herstellung chemisch-kompetenter und elektrokompetenter Bakterien | 46 |
| 4.4.2.1 | CaCl ₂ -kompetente Zellen | 47 |
| 4.4.2.2 | Elektrokompetente Zellen | 47 |
| 4.4.3 | Transformation | 48 |
| 4.4.4 | Selektion | 48 |
| 4.4.5 | Lagerung | 49 |
| 4.4.6 | Rekombinante Protein-Expression in <i>E. coli</i> | 49 |
| 4.4.7 | Rekombinante Expression in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> | 51 |
| 4.4.8 | Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität | 52 |
| 4.4.8.1 | Radial Diffusion Assay (RDA) - Radialdiffusionstest | 52 |
| 4.4.8.2 | Micro Dilutions Assay (MDA) - Mikroverdünnungstest | 53 |
| 4.5 | Proteinbiochemische Methoden | 54 |
| 4.5.1 | Proteinextraktion aus Vollhaut, Epidermis, Kallus und Haarwurzeln | 54 |
| 4.5.2 | Proteinmengenbestimmung | 55 |
| 4.5.2.1 | Spektrometrische Proteinbestimmung | 55 |
| 4.5.2.2 | Proteinbestimmung von komplexen Proteingemischen durch Färbetests | 56 |
| 4.5.3 | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) | 58 |
| 4.5.4 | Proteinfärbungen | 63 |
| 4.5.4.1 | Färbung mit kolloidalem Coomassie | 63 |
| 4.5.4.2 | Silberfärbung | 64 |
| 4.5.4.3 | Zink-Imidazol-Negativ Färbung | 65 |
| 4.6 | Chromatographie | 65 |
| 4.6.1 | Affinitätschromatographie | 66 |
| 4.6.1.1 | Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) | 66 |
| 4.6.1.2 | Immunglobulin-Affinitätschromatographie mit Protein G | 66 |
| 4.6.1.3 | Affinitätschromatographie mit einem über NHS-gebundenen Antigen | 67 |
| 4.6.1.4 | Affinitätschromatographie mit einem über NHS-gebundenen Antikörper | 67 |
| 4.6.2 | Gelpermeationschromatographie/ Größenausschlusschromatographie | 68 |
| 4.6.3 | Umkehrphasen-Chromatographie mit Ionenpaarreagenz | 68 |
| 4.7 | Massenspektrometrie (MS) | 69 |
| 4.8 | Circulardichroismus(CD)-Spektroskopie | 72 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 4.9 | Immunologische Methoden | 72 |
| 4.9.1 | Herstellung polyklonaler Antikörper | 72 |
| 4.9.2 | Immuno-Dot-Blot-Analyse | 73 |
| 4.9.3 | Western-Blot-Analyse | 74 |
| 4.9.4 | Immunhistochemie | 74 |
| 4.10 | Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) | 75 |
| 5 | Ergebnisse | 77 |
| 5.1 | Die genetische Lokalisation und Struktur von TCHHL1 und HRNR | 77 |
| 5.2 | Bioinformatische Proteinanalyse von TCHHL1 und HRNR | 79 |
| 5.2.1 | Phylogenetischer Vergleich des TCHHL1 | 84 |
| 5.3 | TCHHL1 ist in der inneren Haarwurzelscheide exprimiert | 85 |
| 5.4 | TCHHL1 konnte in verschiedenen Extrakten nicht nachgewiesen werden | 87 |
| 5.5 | TCHHL1 ist in stimulierten primären Keratinozyten nachweisbar | 88 |
| 5.6 | In vitro-Cross-linking von TCHHL1 durch Transglutaminase 1 | 89 |
| 5.7 | Die Behandlung der rTCHHL1-Fragmente mit Protein-Arginin Deiminase 1 (PAD1) führte zu einer Veränderung der Antigenität | 90 |
| 5.8 | Ein rTCHHL1-Fragment zeigte minimale antimikrobielle Aktivität | 91 |
| 5.9 | Expression rekombinanter humaner HRNR-Fragmente | 93 |
| 5.9.1 | Aufreinigung und Hydrolyse eines Fusionsproteins | 93 |
| 5.10 | Physikochemische Eigenschaften des Hornerins | 100 |
| 5.10.1 | Anwendung des Glycinloop-Modells auf Hornerin. | 100 |
| 5.10.2 | Die CD-Spektroskopie bestätigt die hohe Flexibilität verschiedener rHRNR- Fragmente | 101 |
| 5.10.3 | Hornerin ist ein „intrinsically disordered protein“ | 103 |
| 5.10.4 | Hornerin zeigt eine erhöhte Proteolyseempfindlichkeit | 106 |
| 5.11 | Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität verschiedener Hornerinfragmente | 112 |
| 5.11.1 | Einfluss der Tyrosine und des Leucins auf die antimikrobielle Aktivität des rHRNR2591-2684 | 114 |
| 5.11.2 | Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von den Argininen im rHRNR2591-2684 | 115 |
| 5.11.3 | Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität kürzerer Hornerinfragmente | 117 |
| 5.11.4 | Einfluss der Versuchsbedingungen auf die antimikrobielle Aktivität | 121 |
| 5.12 | Elektronenmikroskopische Untersuchungen | 125 |
| 6 | Diskussion und Ausblick | 127 |
| 6.1 | Expressions- und Funktionsanalysen des Trichohyalin-like1 | 127 |
| 6.2 | Untersuchungen zur Rolle von Hornerin-Fragmenten als antimikrobielle Faktoren | 132 |
| 7 | Zusammenfassung | 150 |
| 8 | Summary | 152 |
| 9 | Anhang | 154 |
| 10 | Literaturverzeichnis | 167 |
| 11 | Danksagung | 192 |
| 12 | Lebenslauf | 194 |
| 13 | Eidesstattliche Erklärung | 196 |
| 14 | Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit | 197 |

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

| | |
|--|-----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung der Haut des Menschen. | 1 |
| Abb. 2: Sensorische Nerven in der behaarten und unbehaarten Haut..... | 6 |
| Abb. 3: Schematische Darstellung eines Nagels..... | 8 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung der Drüsen der Haut..... | 9 |
| Abb. 5: Anatomischer/ Histologischer Aufbau des Haares. | 12 |
| Abb. 6: Die Haarentwicklung und der Haarzyklus..... | 14 |
| Abb. 7: Epidermale Differenzierung. | 17 |
| Abb. 8: Bildung des „cornified envelope“. | 19 |
| Abb. 9: Austausch von Basentriplets anhand des „overlap extension“-PCR Protokolls..... | 39 |
| Abb. 10: Übersicht über die „QuikChange II site-directed mutagenesis“ Methode..... | 42 |
| Abb. 11: Schematischer Aufbau des Q-ToF 2 Massenspektrometers. | 70 |
| Abb. 12: Chromosomale Lokalisation von TCHHL1 und HRNR auf dem reversen DNA-Strang im Bereich zwischen 152,05 bis 152,39 Mb (Chromosom 1q21.3). | 77 |
| Abb. 13: Darstellung der genetischen Struktur aller sieben bekannten SFTPs..... | 78 |
| Abb. 14: Struktur des TCHHL1- und des HRNR-Gens auf genomischer und mRNA-Ebene sowie die abgeleitete Proteinsequenz. | 79 |
| Abb. 15: Vergleich der S100-Calcium-Bindungs-Domäne/ „EF-hand-like“-Domäne aller sieben SFTPs..... | 80 |
| Abb. 16: Darstellung der repetitiven Einheiten aller 7 SFTPs im Vergleich. | 81 |
| Abb. 17: Aminosäurezusammensetzung des TCHHL1. | 82 |
| Abb. 18: Bioinformatische Analyse für „intrinsically disordered proteins“ mit TCHHL1, TCHH, HRNR und FLG. | 83 |
| Abb. 19: Phylogenetischer Baum für die Orthologen des humanen TCHHL1..... | 84 |
| Abb. 20: Rekombinante TCHHL1-Proteinfragmente/ Epitope der polyklonalen Antikörper. . | 85 |
| Abb. 21: Lokalisation von TCHHL1 und TCHH im Haarfollikel. | 87 |
| Abb. 22: TCHHL1-Western-Blot-Analyse von Keratinozytenüberständen und Lysat. | 88 |
| Abb. 23: Quervernetzung verschiedener TCHHL1-Fragmente mit Transglutaminase 1..... | 90 |
| Abb. 24: Citrullinierung verschiedener rTCHHL1-Fragmente mit Protein-Arginin Deiminase 1 (PAD1). | 91 |
| Abb. 25: Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) eines rekombinant exprimierten rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ -pSUMO3-Fusionsproteins..... | 94 |
| Abb. 26: Umkehrphasen-Ionenpaar-Chromatographie (IP-RPC) eines rekombinant exprimierten rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ -pSUMO3-Fusionsproteins..... | 95 |
| Abb. 27: ESI-Massenspektrometrie (MS) eines rekombinant exprimierten rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ - pSUMO3-Fusionsproteins. | 96 |
| Abb. 28: Größenausschlusschromatographie (SEC) eines rekombinant exprimierten rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ -pSUMO3-Fusionsproteins..... | 97 |
| Abb. 29: Umkehrphasen-Ionenpaar-Chromatographie (IP-RPC) eines mit SUMO-Protease 2 gespaltenen rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ -pSUMO3-Fusionsproteins..... | 98 |
| Abb. 30: ESI-Massenspektrometrie (MS) der drei Fraktionen aus der IP-RPC..... | 99 |
| Abb. 31: Glycinloopmodell für HRNR ₂₅₇₆₋₂₇₀₇ | 100 |
| Abb. 32: CD-Spektroskopie von verschiedenen rHRNR Fragmenten..... | 103 |
| Abb. 33: Aminosäurezusammensetzung des HRNRs. | 104 |
| Abb. 34: Eigenschaften der Hornerinfragmente in der Silber gefärbten SDS-PAGE..... | 105 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 35: Proteolyseempfindlichkeit von rHRNR ₂₅₇₆₋₂₇₀₇ | 107 |
| Abb. 36: Proteolyseempfindlichkeit von rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im Vergleich mit BSA und Cytochrom C..... | 109 |
| Abb. 37: Proteolyse von rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ durch humane Proteasen..... | 110 |
| Abb. 38: Proteolyse von PAD1-citrulliniertem rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ durch humane Proteasen..... | 111 |
| Abb. 39: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität von rHRNR ₂₅₇₆₋₂₇₀₇ und rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im MDA. | 114 |
| Abb. 40: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität von mutiertem rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im Vergleich zu rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im MDA..... | 115 |
| Abb. 41: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität von rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ und citrulliniertem rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im MDA. | 117 |
| Abb. 42: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität von verschiedenen rHRNR _{2591- 2684} Fragmenten im MDA..... | 120 |
| Abb. 43: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität des rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ -pSUMO3- Fusionsproteins in Abhängigkeit von der Nährstoffverfügbarkeit im MDA. | 125 |
| Abb. 44: Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) verschiedener Mikroorganismen nach Inkubation mit rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ | 126 |
| Abb. 45: Schematische Darstellung des pET32(a)-Vektors von Novagen..... | 154 |
| Abb. 46: Schematische Darstellung des pET-SUMO-Vektors von Invitrogen. | 154 |
| Abb. 47: Schematische Darstellung des pSUMO3-Vektors von LifeSensors..... | 155 |
| Abb. 48: Schematische Darstellung des pE-SUMO3-Vektors von LifeSensors..... | 155 |
| Abb. 49: Schematische Darstellung des pPIC α -Vektors von Invitrogen..... | 156 |
| Abb. 50: Schematische Darstellung des pPink-HC-Vektors von Invitrogen. | 156 |
| Abb. 51: Für die rekombinante Expression ausgewählten Bereiche des TCHHL1. | 159 |
| Abb. 52: HRNR-Nukleotid und Proteinsequenz mit rekombinanten Proteinen und Antikörpern. | 164 |
| Abb. 53: Schematische Darstellung aller SNPs im HRNR. | 165 |
| Abb. 54: Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 nach Inkubation mit verschiedenen Antibiotika..... | 166 |

Tabellen

| | |
|---|-----|
| Tab. 1: Trichohyalin-like1-Primer unterschiedlicher Fragmente. | 30 |
| Tab. 2: Hornerin-Primer unterschiedlicher Fragmente und unterschiedlicher Mutationen... | 31 |
| Tab. 3: Sequenzierprimer. | 32 |
| Tab. 4: Übersicht über die Volumina und Kulturbedingungen im Radialdiffusionstest. | 52 |
| Tab. 5: Antimikrobielle Aktivität verschiedener rTCHHL1-Fragment gegen <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> und <i>B. megaterium</i> | 92 |
| Tab. 6: Einfluss der Citrullinierung des Hornerins auf die Proteolyseempfindlichkeit. | 112 |
| Tab. 7: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität verschiedener Hornerinfragmente im RDA. | 113 |
| Tab. 8: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von citrulliniertem rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ - pSUMO3-Fusionsprotein im RDA..... | 116 |
| Tab. 9: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von verschiedenen rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ - Fragmenten im RDA. | 119 |
| Tab. 10: Salzabhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität für rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im RDA..... | 122 |
| Tab. 11: Ergebnis der Suche nach Sequenzähnlichkeiten zum humanen TCHHL1. | 157 |
| Tab. 12: rekombinante Proteine aus dem Hornerin-Fragment 2576 bis 2707..... | 160 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| ♂ | Männlich |
| ♀ | Weiblich |
| % C | prozentualer Grad der Vernetzung |
| % T | Acrylamidkonzentration |
| α | Anti |
| Å | Ångström (10^{-10}m) |
| APS | Aminoperoxydisulfat |
| AU | „absorbance units“ - Spektrales (dekadisches) Absorptionsmaß |
| BLAST | „Basic Local Alignment Search Tool“ |
| bp | Basenpaare |
| BHI | „Brain-Heart Infusion“ |
| BSA | „Bovine Serum Albumine“ - Rinderserumalbumin |
| cDNA | „complementary DNA“ |
| CFU | „colony forming unit“ - Koloniebildende Einheit |
| CHAPS | 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate |
| CTAB | Cetyltrimethylammoniumbromid |
| Da | Dalton |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleotide |
| dsDNA | doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDC | „Epidermal Differentiation Complex“ |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESI | „Electro Spray Ionisation“ - Elektrosprayionisierung |
| EST | „Expressed Sequence Tag“ |
| EtOH | Ethanol |
| FPLC | „Fast Protein Liquid Chromatography“ |
| hBD | humanes beta-Defensin |
| HPLC | „High Performance Liquid Chromatography“ |
| HRNR | Hornerin |
| HRP | „Horseradish Peroxidase“ - Meerrettichperoxidase |
| IDP | „Intrinsically Disordered Protein“ |
| IgG | Immunglobulin des Typs G |
| IMAC | immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie |
| IP-RPC | „Ion Pair-Reversed Phase Chromatography“ |
| IPTG | Isopropylthiogalaktosid |
| kbp | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| KLH | „Keyhole Limpet Hemocyanin“ - Hämocyanin der Schlüssellochschnecke |
| KLK | Kallikrein |
| LB | „Lysogeny Broth“ |
| LD ₉₀ | Letale Dosis mit mindestens 90 % Abtötung |

| | |
|-------------------|--|
| M | Molar |
| MBK | Minimale bakterizide Konzentration |
| MCS | „multiple cloning sites“ |
| Mbp | Megabasenpaare |
| MDA | „Micro Dilution Assay“ - Mikroverdünnungstest |
| Mr | relatives Molekulgewicht |
| mRNA | „messenger RNA“ |
| MS | Massenspektrometrie |
| NaP | Natriumphosphatpuffer |
| NC | Nitrocellulose |
| NCBI | „National Center for Biotechnology Information“ |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| NMF | „Natural Moisturizing Factors“ - wasserbindende Stoffe |
| NP-40 | Nonoxinol 40 - „Polyethylene glycol nonylphenyl ether“ |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| PAD | „Protein-Arginin Deiminase“ oder „Peptidylarginine Deiminase“ |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | „Phosphate-Buffered Saline“ |
| PCR | „Polymerase Chain Reaction“ - Polymerase-Kettenreaktion |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| ppm | „Parts per Million“ |
| RDA | „Radial Diffusion Assay“ - Radialdiffusionstest |
| RIPA | „Radio Immunoprecipitation Assay“ |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | „revolutions per minute“ - Umdrehungen pro Minute |
| SDS | „Sodium Dodecyl Sulfate“ - Natriumlaurylsulfat |
| SEC | „Size Exclusion Chromatography“ - Größenausschlußchromatographie |
| SFTP | „S100 Fused Type Protein“ |
| SNP | „Single Nucleotid Polymorphism“ - Einzelnukleotid-Polymorphismus |
| ssDNA | „single strand DNA“ - einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure |
| SUMO | „Small Ubiquitin-Like Modifier“ |
| TBS | „Tris-Buffered Saline“ |
| TCEP | Tris(2-carboxyethyl)phosphin |
| TCHH | Trichohyalin |
| TCHHL1 | Trichohyalin-like1 |
| TEM | Transmissions-Elektronen-Mikroskopie |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TGase | Transglutaminase |
| TKA-Wasser | Reinstwasser Typ1 nach ISO 3696: 1987 bzw. ASTM Typ1 |
| ToF | „Time of Flight“ - Flugzeit |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| TSB | „Tryptic Soy Broth“ |
| U | Unit(s) |
| UTR | untranslatierte Region |

| | |
|-----|-------------------------|
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| x g | fache Erdbeschleunigung |

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Bedeutung der Haut ergibt sich aus den physiologischen Funktionen und den pathologischen Ereignissen (Agache, 2004a).

1.1.1 Aufbau der Haut

Die Haut eines erwachsenen Menschen hat eine durchschnittliche Oberfläche von $1,8 \text{ m}^2$ und eine durchschnittliche Dicke von $1,2 \text{ mm}$. Daraus ergibt sich für das Organ Haut ein Volumen von $3,5 \text{ L}$. Das Gewicht der Haut beträgt inklusive des halben Liters Blut, der sich in den Blutgefäßen und den Kapillaren befindet, $4,7 \text{ kg}$ ($6,7 \%$ bei 70 kg Körpergewicht) (Agache, 2004a).

Die Haut besteht aus mehreren sich voneinander unterscheidenden Schichten. Von außen nach innen werden hierbei die ca. $0,1 \text{ mm}$ dicke Epidermis (Oberhaut), die ca. $1,1 \text{ mm}$ dicke Dermis (Lederhaut) und die zwischen $0,1 \text{ mm}$ und mehreren Zentimetern dicke Subkutis (Unterhaut) voneinander abgegrenzt.

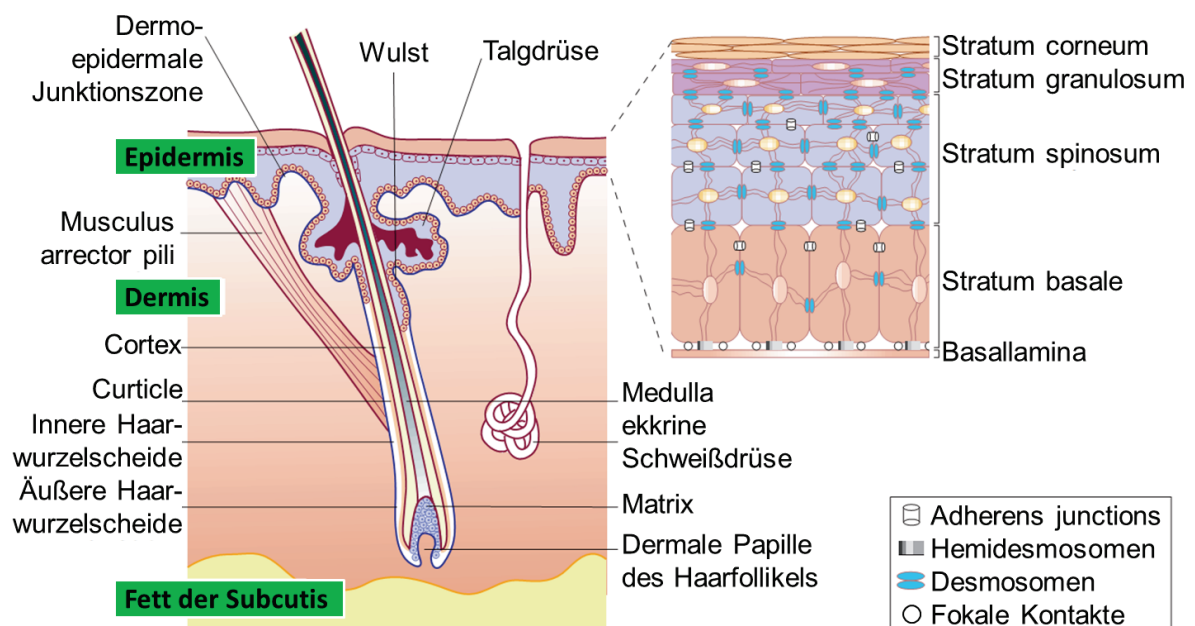


Abb. 1: Schematische Darstellung der Haut des Menschen. Gezeigt sind die verschiedenen Schichten sowie die Hautanhangsorgane (modifiziert nach (McGrath und Uitto, 2010))

Die Epidermis lässt sich rein morphologisch in vier weitere Schichten unterteilen. Dabei wird die oberste nur ca. $0,01 \text{ mm}$ dicke Schicht als Stratum corneum (Hornzellschicht) bezeichnet. Diese besteht je nach Lokalisation aus 6 bis 120 Schichten aus abgestorbenen, stark

modifizierten Keratinozyten, die in diesem hochgradig differenzierten Zustand als Korneozyten bezeichnet werden. (Christophers und Kligman, 1964; Ya-Xian et al., 1999). Darauf folgt das Stratum granulosum (Körnerzellschicht), dessen Keratinozyten schon weitgehend abgeflacht sind aber noch einen Zellkern enthalten, das Stratum spinosum (Stachelzellschicht), in dem die Keratinozyten die Differenzierung einleiten und das Stratum basale (Basalzellschicht), dessen Keratinozyten auf der Basallamina, der Trennschicht zwischen Epidermis und Dermis, verankert sind.

Bei der Haut können zwei morphologisch unterschiedliche Oberflächen voneinander differenziert werden. Der größte Teil der Oberfläche wird von der sogenannten Felderhaut bedeckt. Die Felderhaut zeigt je nach Lokalisation unterschiedliche Ausprägungen an Strukturierung. Die Felderhaut enthält Haare und damit verbunden auch sogenannte Talgdrüsen (Glandula sebacea). Der Talg ist eine Mischung aus unterschiedlichen Lipiden und Proteinen, die das Haar geschmeidig halten sollen. Damit wird die Hautoberfläche der Felderhaut mit einem sehr feinen fettartigen Film überzogen, der zusammen mit den Haaren die Reibung erniedrigt (Agache, 2004c). Von der behaarten Felderhaut lässt sich die vollkommen unbehaarte Leistenhaut abgrenzen. Mit der Leistenhaut sind sowohl die Handinnenflächen als auch die Fußsohlen bedeckt. Auffällig sind an der Leistenhaut das völlige Fehlen von Haaren, die große Anzahl von Schweißdrüsen und die Hautleisten, die in ihrer Gesamtheit den spezifischen Fingerabdruck eines jeden Menschen erzeugen. Diese Form der Oberflächenstruktur wurde in der Entwicklungsgeschichte vermutlich herausgebildet, um einen besseren Halt am Boden und an Objekten zu ermöglichen (Highley et al., 1977). In den Handinnenflächen und auf den Fußsohlen wird kontinuierlich Schweiß produziert, der sowohl für die erhöhte Reibung und den damit einhergehenden besseren Halt als auch für den Schutz vor Bodenkeimen durch entsprechende Faktoren verantwortlich ist (Yamaguchi et al., 2011). Unter erhöhter mechanischer Beanspruchung wird die Haut zur vermehrten Bildung von hornbildenden Zellen (Keratinozyten) angeregt; als Folge wird das Stratum corneum im beanspruchten Areal dicker (Kim et al., 2010). Aufgrund der Druckbelastung und der Reibung bilden sich Verdickungen des Stratum corneums vor allem unter den Fußsohlen und in den Handinnenflächen. Diese Verdickungen werden als Hornschwiele oder auch Kallus bezeichnet.

1.1.2 Funktionen der Haut

Die Haut hat die Funktion einer physikalischen, chemischen und biologischen Barriere (Proksch et al., 2008).

1.1.2.1 Physikalische Barriere: Schutz vor UV-Strahlung und mechanischen Kräften

Der Körper als Ganzes und insbesondere die Haut als äußere Oberfläche sind der uns umgebenden elektromagnetischen Strahlung ausgesetzt. Die Strahlung ist zum Teil physiologisch notwendig aber auch die Ursache pathologischer Vorgänge. Diese Ambivalenz ist dabei von der Energie der Strahlung und somit von der Eindringtiefe abhängig. Je kurzwelliger, also energiereicher die Strahlung ist, desto tiefer kann diese in den Körper eindringen. Schaden kann die Strahlung nur anrichten, wenn sie in der Lage ist, von der Materie, also den Bestandteilen der Haut, absorbiert zu werden. Um eine Schädigung der biologisch essentiellen Moleküle zu verhindern, besitzt die Haut zwei Barrieren gegen die schädigende UV-Strahlung: eine Melaninbarriere in der gesamten Epidermis und eine Proteinbarriere hauptsächlich im Stratum corneum. Diese beiden Barrieren absorbieren einen Großteil der schädigenden UV-Strahlung, und verhindern auf diesem Wege eine Schädigung der DNA und anderer zellulärer Bestandteile (Archer, 2010a).

Die Schutzfunktion der Haut vor mechanischen Kräften wird durch eine hohe Festigkeit der Epidermis, eine hohe Elastizität der Dermis und dem elastischen Polster des subkutanen Fettgewebes gewährleistet. Damit bietet die Haut Schutz vor Zug, Druck, Stoß und Verschiebung. Das Stratum corneum hält die größten Schädigungen durch die dachziegelartig übereinanderliegenden Korneozyten direkt ab (Menon et al., 2012). Die Deckzellschicht der Epidermis wirkt wie ein Scherengitter; so werden Verschiebungen abgeschwächt. Die Epidermis und Dermis sind durch die Epidermiseinstülpungen und die Coriumpapillen reiðverschußartig miteinander verzahnt, so dass hier Zug und Verschiebungen abgefangen werden. Die Retikularschicht der Haut mit ihren kollagenen und elastischen Faserzügen gewährleistet, auch durch einen verschieden gerichteten Faserverlauf, bestmöglichen Schutz gegen mechanische Spannungen (Hussain et al., 2013).

1.1.2.2 Chemische Barriere: Schutz vor Austrocknung und Verlust bzw. Eintrag von Stoffen

Durch die chemische Barriere der Haut soll sowohl der Durchtritt von Wasser, Elektrolyten und anderen gelösten Stoffen von innen nach außen als auch in die entgegengesetzte Richtung verhindert werden (Proksch et al., 2008). Die Bedeutung der chemischen Barriere wird insbesondere bei dem mechanischen oder thermischen Verlust der Epidermis in Folge von Abschürfungen oder Verbrennungen erkennbar. Durch diese Barriestörung kommt es zum Verlust von Wasser und Elektrolyten und, abhängig von der Größe des betroffenen Areals, zu lebensbedrohlichen Zuständen (Greenhalgh, 2009). Die Eigenschaften der Barriere,

sobald sie etabliert ist, basiert einzig auf physikochemischen Eigenschaften und ist dann nur noch bei der Erneuerung von den energieverbrauchenden Aktivitäten lebender Zellen abhängig.

1.1.2.3 Biologische Barriere: Schutz vor Mikroorganismen

Als Grenzorgan des menschlichen Körpers kommt die Haut ständig in Kontakt mit Mikroorganismen und ist mit einer stabilen, individuellen mikrobiellen Hautflora gerade in den obersten verhornten Zellschichten besiedelt (Lange-Asschenfeldt et al., 2011; Mathieu et al., 2014; Nakatsuji et al., 2013; Zeeuwen et al., 2012). Für die Gewährleistung dieses Gleichgewichtes verfügt die Haut über verschiedene Regulationsmechanismen. Durch die Desquamation, die Abschuppung der obersten verhornten Hautschichten, kommt es zu einer Ablösung von mikrobiell kolonisierten Regionen. In Konsequenz besiedeln nur ständig wachsende mikrobielle Populationen die Haut. Diese Regulation wird unterstützt durch eine hydrophobe Oberfläche, welche durch die Einlagerung von Lipiden und die Freisetzung von hydrophoben Stoffen durch die Talgdrüsen bedingt ist. Die Lipide repräsentieren einen Teil der antimikrobiellen Aktivität (Bratt et al., 2011), ein weiterer Teil wird durch antimikrobielle Peptide, die sowohl konstitutiv als auch induzierbar in der Haut sowie in den Schweißdrüsen gebildet werden (Harder und Schröder, 2005), erzeugt. Zusätzlich spielt die Nährstofflimitierung eine weitere Rolle, die zum Teil durch die ausgeprägte Verbrückung durch kovalente Bindungen in Form von Isopeptidbindungen (Transglutaminierung) und Disulfidbrücken die Zugänglichkeit zu Aminosäuren aus den Proteinen des Stratum corneum und des Haares verhindert oder zumindest erschwert.

1.1.2.4 Selbsterhaltung und Selbstreparatur

Mit der Barrierefunktion der Epidermis ist die Funktion zur Regeneration und der Wiederherstellung dieser Barriere eng verknüpft. Die Regeneration erfolgt durch ein Reservoir an Stammzellen, die die kontinuierliche Erneuerung ermöglichen (Fuchs und Horsley, 2008). Kommt es zu einer Verletzung der Haut und einer Störung der Barriere, wird sofort die Wundheilung ausgelöst. Dabei sind die primären Ziele ein schneller Verschluss der Wunde und eine funktionelle Narbenbildung (Singer und Clark, 1999). Eine sichtbare Narbe bildet sich nur wenn der Wundspalt eine bestimmte Größe überschreitet und neben der Epidermis auch die Dermis und die tiefer liegenden Gewebe beteiligt sind. Die Wundheilung erfolgt in drei Schritten. Als erstes kommt es zu einer Entzündungsreaktion, auf diese folgt eine Gewebeneubildung und abschließend ein Umbau des Gewebes (Gurtner et al., 2008). Bei der

Wundheilung ist die Reepitalisierung der entscheidende Schritt (Safferling et al., 2013). Hierbei wird die Barriere in der ursprünglichen Form wieder hergestellt. Die Bedeutung der Barriere bzw. der Epidermis wird besonders dann deutlich, wenn diese großflächig verloren geht. Dieses kann in akuter Form durch mechanische, chemische oder thermische Einwirkung in Form von Abschürfungen, Verätzungen oder Verbrennungen erfolgen oder aber als chronische Wunde. Allen diesen Barriereverlusten sind ein erhöhter Wasserverlust, eine ausgeprägte Entzündungsreaktion sowie die Besiedlung der Wunde mit Pathogenen gemeinsam (Percival et al., 2012b).

1.1.2.5 Soziale, psychologische und sexuelle Funktionen

Neben den physiologischen Funktionen erfüllt die Haut auch soziale und psychologische Funktionen. Dabei ist die nonverbale Kommunikation das zentrale Element des Kommunikationsorgans Haut. So werden Gefühlsregungen durch die Haut sichtbar, z. B. bei Scham, Wut oder Freude errötet die Haut, bei Anspannung schwitzt sie oder unter bestimmten Umständen zeigt sie eine „Gänsehaut“. Als soziale Komponente ist der „Hautkontakt“ von zentraler Bedeutung. Dabei spricht die Haut eine universelle Sprache, die von jedem verstanden wird.

Daneben werden die Haut und ihre Anhangsgebilde temporär durch Kosmetika oder aber dauerhaft z. B. durch Tattoos verändert, um so nonverbale Botschaften zu übertragen.

Neben den visuellen bzw. taktilen Informationen, werden durch die Haut, bzw. durch die in ihr lokalisierten Drüsen, unsichtbar Informationen verbreitet. Der Geruch eines Individuums ist eine spezifische Eigenschaft, die durch die besiedelnden Mikroorganismen und biologische Rhythmen und Ereignisse moduliert wird.

Auch hier wird durch Duftstoffe in Form von Kosmetika und Konsumgütern, z. B. Waschmitteln oder Seifen, der individuelle Duft verändert (Ebling, 1992).

1.1.3 Funktionen der Haut in Kooperation mit anderen Organen

1.1.3.1 Sensorische Funktionen

Die Haut ist von einem dichten dreidimensionalen Netz von afferenten sensorischen und efferenten autonomen Nervenbahnen durchzogen. Das sensorische Nervensystem nimmt dabei die Reize der Berührung, der Vibration, des Druckes, der Temperatur, des Schmerzes und des Juckreizes auf (Abb. 2). Das autonome Nervensystem der Haut ist für die Aufrechterhaltung der Homöostase erforderlich, indem es die motorischen Funktionen der

Gefäße, die Spannung des Musculus arrector pili (Abb. 1) und die Sekretion der ekkrinen Schweißdrüsen beeinflusst (Metze und Luger, 2001).

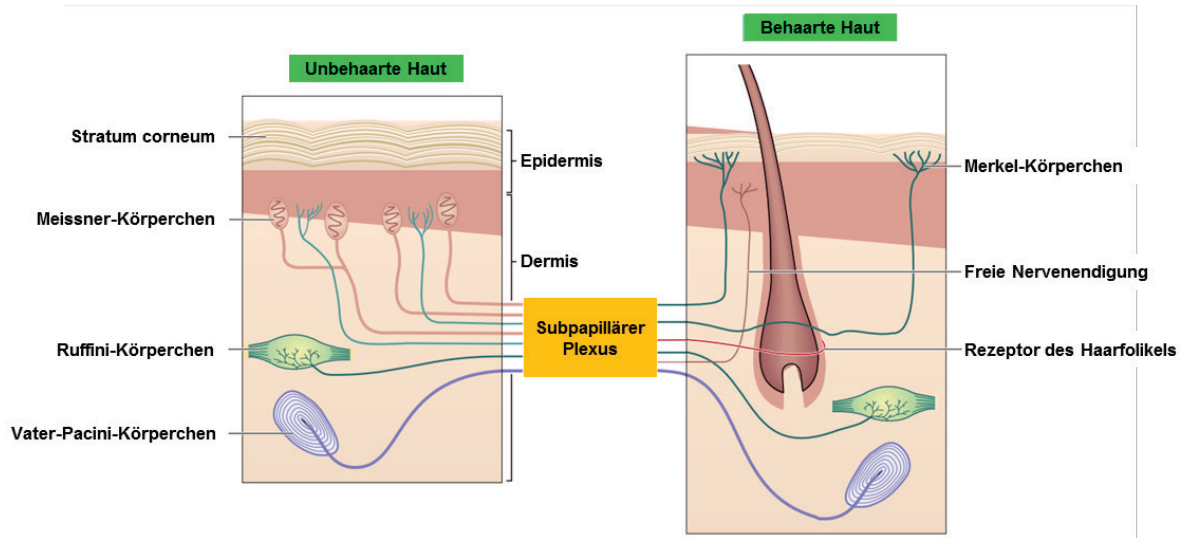


Abb. 2: Sensorische Nerven in der behaarten und unbehaarten Haut. (modifiziert nach (Archer, 2010a))

1.1.3.2 Kontrolle der Körpertemperatur

Im Gegensatz zu wechselwarmen werden bei gleichwarmen Tieren durch eine konstante Körpertemperatur enzymatische Stoffwechselreaktionen bei Änderungen der Umgebungstemperatur wenig beeinflusst. Die menschliche Haut hat eine mittlere Oberflächentemperatur von 34°C (32°C an den Extremitäten und 36°C an der Stirn) (Agache, 2004b). Die Balance von Wärmeproduktion und Wärmeabfuhr in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur bedarf sensorischer Signale (s.o.) und der Möglichkeit die Wärmeabgabe zu regulieren. Wärme kann dabei über die Hautoberfläche durch Strahlung, Konvektion, Ableitung oder Verdunstung abgegeben werden. Von zentraler Bedeutung ist hierbei das Blutgefäßsystem der Haut, das größer ist als das zur Versorgung mit Nahrung notwendige Gefäßsystem. Der zentrale Punkt ist hierbei ein System von arteriovenösen Shunts, also Kurzschlüssen zwischen Ateriolen und Venolen, hauptsächlich in den Füßen, Händen, Lippen, Nase und Ohren, die eine Regulierung des Abstandes des durchströmten Kapillarnetzes zur Oberfläche ermöglichen. Somit kann bei einer oberflächennahen Durchblutung mehr Wärme abgegeben werden, bei einer oberflächenferneren mehr Wärme zurückgehalten werden. Bei hohen Umgebungstemperaturen wird zusätzlich durch die Verdunstungskälte des Schweißes der ekkrinen Schweißdrüsen eine Kühlung erreicht (Archer, 2010a).

1.1.3.3 Funktionen der Immunität

Die immunologischen Funktionen der Haut bestehen neben der bereits genannten biologischen Barriere in der Vermittlung der zellulären Immunität. Hier sind die Keratinozyten und die Langerhans'schen Zellen als antigenpräsentierende Zellen und die T-Zellen als Effektorzellen zu nennen. In der Haut ist die Mehrzahl der T-Zellen in der Dermis, hauptsächlich um die postkapillären Venen und in den Hautanhangsorganen, zu finden. In der Epidermis lassen sich weniger als 10 % der Haut residenten T-Zellen nachweisen (Archer, 2010b).

1.2 Die Hautanhangsgebilde

1.2.1 Nägel

Die Nägel der Hände als auch der Füße haben die Funktion den distalen Teil der Phalangen zu schützen, das taktile Vermögen zu verbessern und das Greifen kleinerer Objekte zu ermöglichen. Daneben werden die Nägel für das Kratzen und Putzen sowie als Waffen eingesetzt. Des Weiteren sind die Fußnägel für die Biomechanik von Bedeutung (Tosti und Piraccini, 2008).

Das Nagelorgan (Abb. 3) umfasst die Nagelmatrix, die die Nagelplatte hervorbringt, das darunter liegende Nagelbett und das perungale Gewebe, bestehend aus den lateralen Nagelwällen, dem Hyponychium, dem dorsalen Nagelwall und dem Nagelhäutchen aus Eponychium und Cuticula. Die Nagelplatte besteht aus einer kompakten Schicht aneinanderhaftender Hornschuppen und erreicht eine Dicke am Finger von 0,5 mm (♀) bzw. 0,6 mm (♂) und am Fuß von 1,38 mm (♀) bzw. 1,65 mm (♂) (Paus et al., 2008). Die durchschnittliche Regenerationszeit eines Fingernagels beträgt sechs Monate, die eines Fußnagels 12 bis 18 Monate (Tosti und Piraccini, 2008).

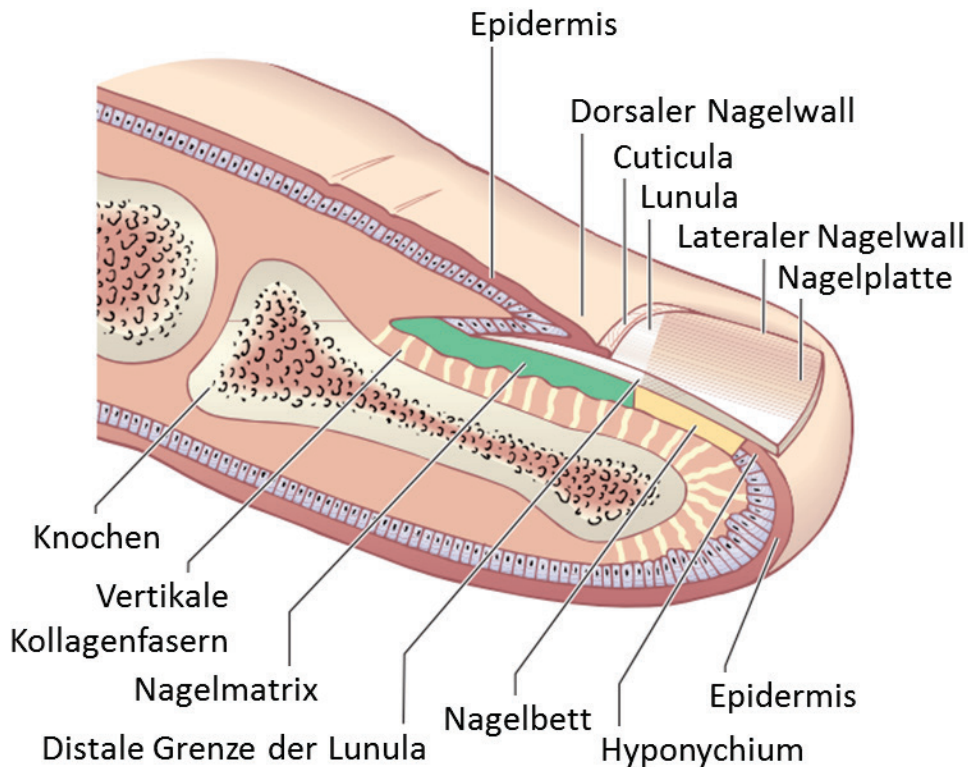


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Nagels. (modifiziert nach (de Berker und Baran, 2010))

1.2.2 Schweißdrüsen

Die Schweißdrüsen lassen sich in ekkrine, apokrine und apoekkrine Drüsen unterteilen. Die ekkrinen Schweißdrüsen bedecken die gesamte Körperoberfläche mit wenigen Ausnahmen, z. B. den Lippen und dem Gehörgang. Die höchste Dichte ist im Bereich der Leistenhaut zu finden. Sie werden durch emotionale und thermale Reize aktiviert und sind für die Thermoregulation von zentraler Bedeutung (Mauro und Goldsmith, 2008). Der sekretorische Anteil der Drüse besteht aus einem knäulartig aufgewickelten Gang, der über einen langen dünnen, meist schraubenförmig angelegten Ausführungsgang mit der Oberfläche verbunden ist (Abb. 4). Die Zellen sekretieren den Schweiß indem die Flüssigkeit direkt aus den Zellen abgegeben wird. Die apokrinen Schweißdrüsen kommen unter den Achseln, um den Nabel und die Brustwarzen und im anogenitalen Bereich vor. Der Aufbau ähnelt dem der ekkrinen Schweißdrüse, allerdings ist das Lumen der Gänge größer und der Ausführungsgang endet im follikulären Kanal eines Haares (Abb. 4). Die Funktion dieser Drüsen ist noch unklar allerdings ist bekannt, dass die apokrinen Schweißdrüsen auf emotionale Stimulierungen, wie Angst oder Schmerz reagieren (Wilke et al., 2007). Die Zellen sekretieren indem sie äußere Teile der Zelle abschnüren und ins Lumen abgeben. Die apoekkrinen Schweißdrüsen sind eine Mischung aus den beiden genannten Schweißdrüsen (Sato et al., 1987). Die Lokalisation der apoekkrinen Schweißdrüsen ist mit den apokrinen Schweißdrüsen identisch.

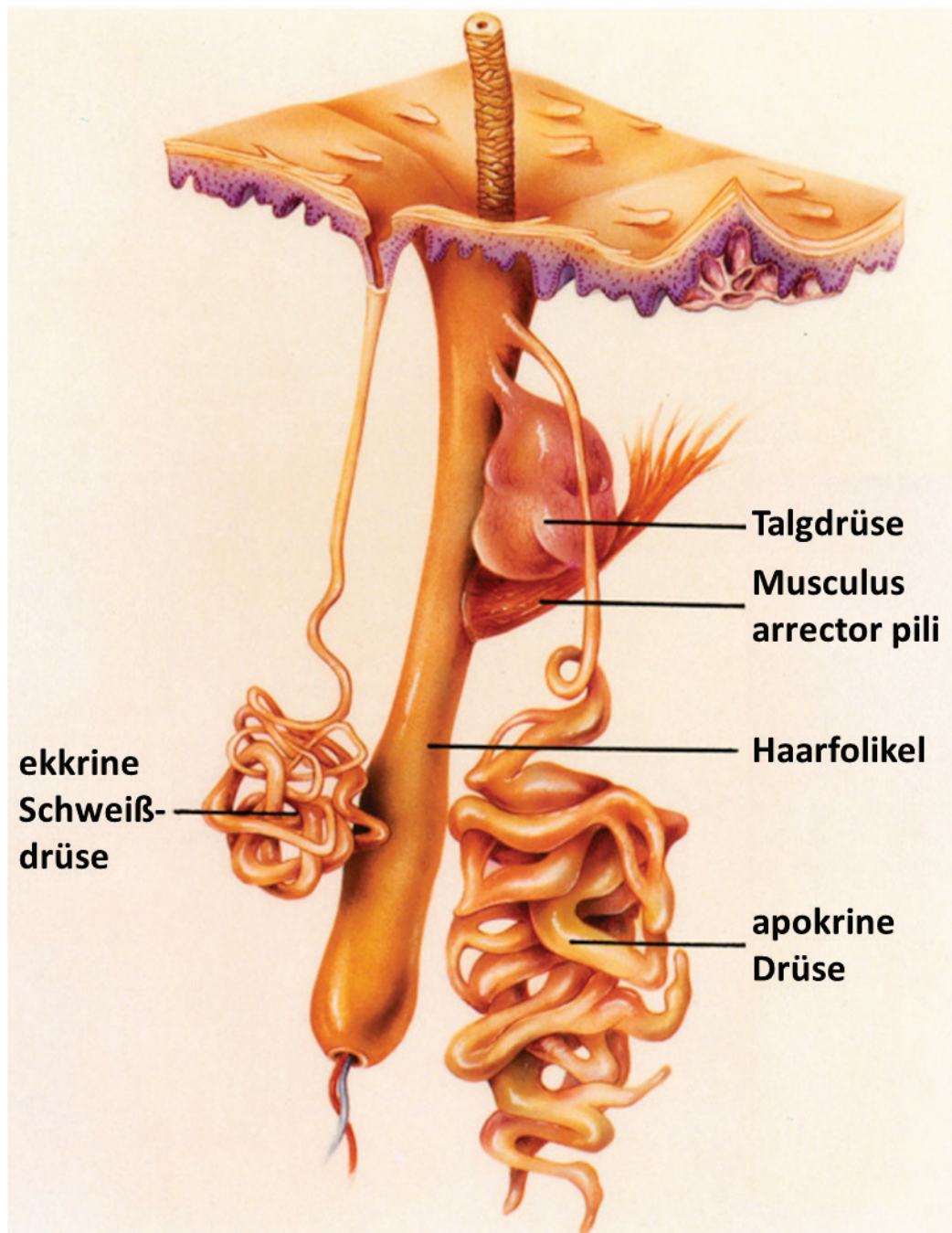


Abb. 4: Schematische Darstellung der Drüsen der Haut. In der Abbildung werden eine Talgdrüse, eine apokrine Drüse und eine ekkrine Schweißdrüse angeordnet um einen Haarfollikel dargestellt. Diese drei Strukturen bilden die anatomische und funktionelle Einheit des „axillary organ,, der Achsel von Schimpanse, Gorilla und Mensch (modifiziert nach (Montagna et al., 1992)).

Die Zusammensetzung des ekkrinen Schweißes variiert mit der Zeit, zwischen den verschiedenen Individuen und der Lokalisation der Schweißdrüsen auf der Körperoberfläche. Die Hauptbestandteile sind neben Wasser (99 %), Natriumionen, Chloridionen, Kaliumionen, Kalzium, Magnesium, Ammoniak, Aminosäuren, Harnstoff, Bikarbonat und Laktat (Mauro und Goldsmith, 2008; Wilke et al., 2007). Der pH-Wert liegt zwischen zwischen 4,0 und 6,8 (Coulson, 2010). Daneben enthält der Schweiß auch antimikrobielle Peptide wie Dermcidin

(Schittek et al., 2001), Lactoferrin (Yamaguchi et al., 2011) und Fragmente des Filaggrin-2 (Hansmann, 2009).

1.2.3 Talgdrüsen

Talgdrüsen sind zum größten Teil mit Haaren assoziiert, kommen aber auch als sogenannte freie Talgdrüsen auf den Lippen, den Augenlidern, den Brustwarzen und den Schleimhäuten vor. Die Drüsen sind weintraubenartig geformt. Dabei ist jedes beerenförmige Drüsenendstück über einen gemeinsamen Ausführungsgang mit dem assoziierten follikulären Kanal des Haares verbunden. Die Lipid-produzierenden Talgdrüsenzellen, Sebozyten genannt, desintegrieren während des Differenzierungsprozesses und geben ihren Inhalt, den Talg, frei. Der Talg besteht aus Glyceriden, freien Fettsäuren, Wachsestern, Squalen, Cholesterolestern und Cholesterol (Schaller und Plewig, 2008). Die Glyceride werden in freie Fettsäuren gespalten, von denen für Laurinsäure (C12:0) und Sapiensäure (C16:1Δ6) antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden konnte (Bratt et al., 2011; Drake et al., 2008). Daneben kommen auch antimikrobielle Peptide wie Cathelicidin (LL-37) (Lee et al., 2008), humanes beta-Defensin-2 (hBD-2) (Nakatsuji et al., 2010) und Histon H4 (Lee et al., 2009) im Talg vor. Trotzdem konnten in den Talgdrüsen Bakterien und Pilze der normalen Hautflora nachgewiesen werden (Schaller und Plewig, 2008).

1.2.4 Haare

Die Haare entwickelten sich phylogenetisch vor ca. 200 Millionen Jahren zusammen mit den Säugetieren. Möglicherweise hatten aber auch schon inzwischen ausgestorbene säugetierähnliche Reptilien Haare, die als Sinnesorgane fungierten (Morioka, 2005).

Der Haarfollikel kann als komplexes Miniorgan verstanden werden. Jeder Haarfollikel wird dabei aus mehreren mesenchymalen und epithelialen Zellschichten aufgebaut. Insgesamt sind mehr als 20 verschiedene Zellpopulationen am Aufbau beteiligt. Zusammen mit der Talgdrüse und dem Haarbalgmuskel bildet der Haarfollikel die sogenannte „pilosebaceous unit“ (Vogt et al., 2008). Die Haarfollikel und damit auch die Haare unterscheiden sich in Größe und Struktur in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation auf der Körperoberfläche. So lassen sich Kopfhare von Augenbrauen, Wimpern, Barthaaren, Achselhaaren, Schamhaaren, der Körperbehaarung (Vellushaar) und dem Flaumhaar des Fetus bzw. Neugeborenen (Lanugohaar) unterscheiden. Dabei zeigen sie aber alle einen identischen Aufbau.

Die molekulare Zusammensetzung des Haares ist stark von seinen histologischen Strukturen abhängig. Das eigentliche Haar, also der sich außerhalb der Haut befindliche Teil, besteht von außen nach innen aus den drei strukturellen Schichten: Kutikula, Cortex und der nicht immer vorhandenen zentralen Medulla (Abb. 5). Diese bestehen hauptsächlich aus Keratin-Filamenten, die aus 17 Haar-spezifischen Keratinen aufgebaut sind (Moll et al., 2008). Zwischen den Keratin-Filamenten befindet sich ein amorpher Bereich, die sogenannte Matrix, die aus den über 80 verschiedenen Haar-Keratin-assoziierten Proteinen (KAPs) gebildet wird (Shimomura und Ito, 2005).

Das Haar umgibt bis knapp unterhalb des Ausführungsgangs der Talgdrüse die innere Haarwurzelscheide, die von außen nach innen aus der Henle-Schicht, Huxley-Schicht und Kutikula der inneren Haarwurzelscheide aufgebaut ist. In diesen Schichten werden ebenfalls 8 Haarwurzel-spezifische Keratine exprimiert (Moll et al., 2008).

Die Haarwurzel wird durch die äußere Haarwurzelscheide begrenzt. Diese kann als Fortführung der Epidermis entlang der Haarwurzel gesehen werden. Als Grenze zwischen der äußeren Haarwurzelscheide und der umgebenden Dermis fungiert die Basallamina, die die dermale Papille von den Keratinozyten der Haarmatrix des Bulbus trennt (Woodley und Chen, 2001). Im Bulbus sitzen auf der Basallamina der dermalen Papille die das Haar bildenden Zellen, die Zellen die den Kontakt zur Basallamina verlieren werden als undifferenzierte Matrixzellen bezeichnet. Diese ordnen sich in Reihen an und steigen aus der Matrix des Bulbus in die keratinisierende Zone auf. Die Matrixzellen bilden alle Zellen des Haarfollikels: den Haarschaft (Medulla, Kortex und Kutikula), die inneren Haarwurzelscheide (Henle-Schicht, Huxley-Schicht und Kutikula der inneren Haarwurzelscheide) und die äußere Haarwurzelscheide. Die Keratinisierung beginnt mit der Henle-Schicht kurz oberhalb des Bulbus gefolgt von den Zellen der Kutikula. Oberhalb der keratinisierenden Zone ist die Kornifizierung der Kutikula abgeschlossen. Im Zentrum des Haarschafts bildet sich eine unterbrochene Reihe von Zellen der Medulla. In der Papille befinden sich Melanocyten, die dem Haar seine Farbe geben. Dabei werden sogenannte Melaningranula an die Zellen des Kortex und der Medulla abgegeben nicht aber an Zellen der Kutikula oder der inneren Haarwurzelscheide. Insgesamt betrachtet, ist der Haarfollikel vergleichbar mit einer Drüse, die holokrin Haarmaterial sekretiert (Montagna et al., 1992).

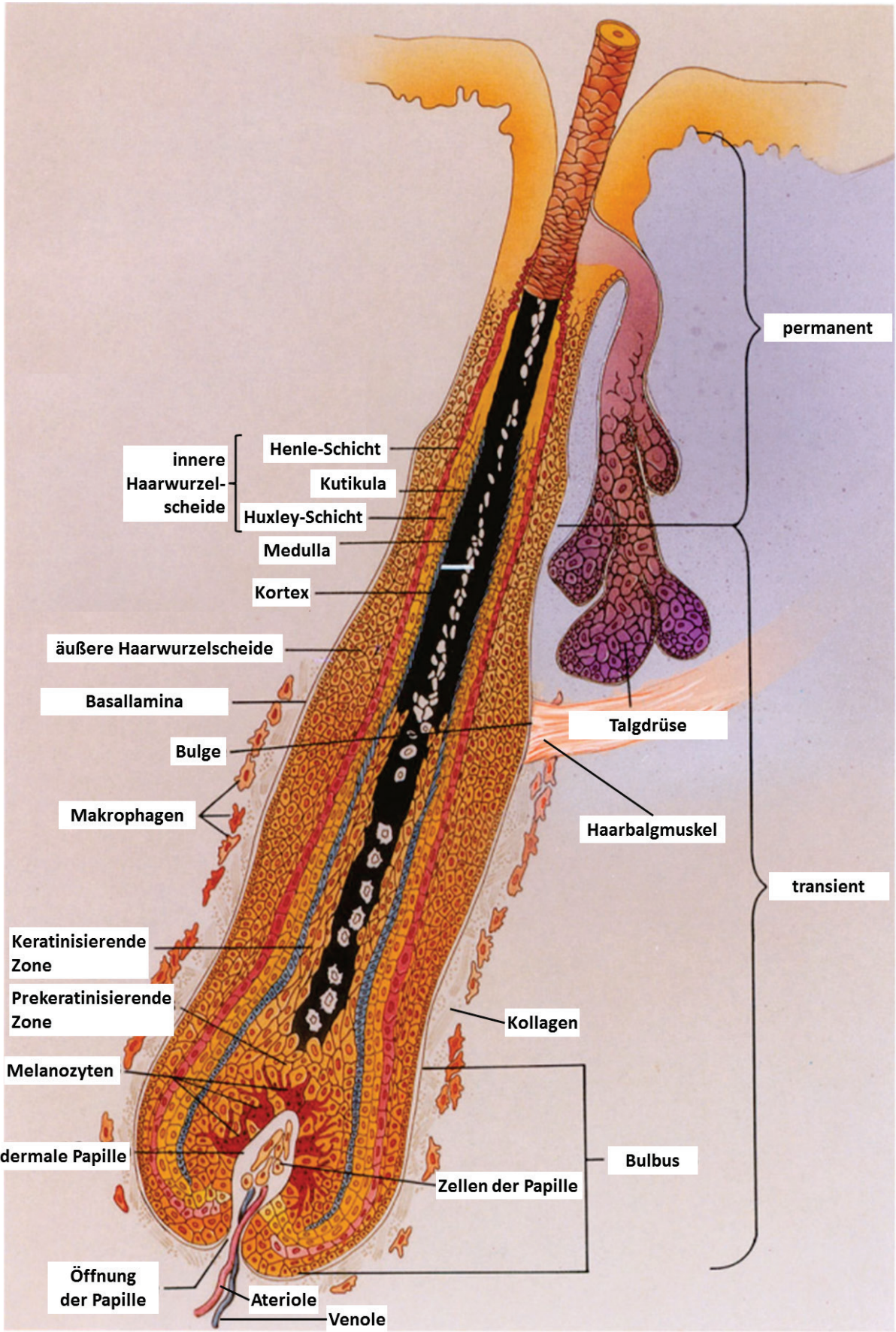


Abb. 5: Anatomischer/ Histologischer Aufbau des Haares. (modifiziert nach (Montagna et al., 1992))

Zum Zeitpunkt der Geburt ist der Körper von ungefähr 5 Millionen Haarfollikeln bedeckt (Paus und Cotsarelis, 1999). Weitere Haarfollikel werden nicht mehr gebildet, einzig die Größe kann sich im Laufe der Zeit unter dem Einfluss von androgenen Hormonen verändern. Der der Bildung des Haarfollikels zugrundeliegende Prozess wird auch bei anderen Hautanhangsgebilden in ähnlicher Weise durchlaufen (Chuong, 1998). Während der epithelialen Reduplikation entstehen neben dem Haar auch Nägel, Milchdrüsen und Zähne (Paus et al., 2008). Bei der Bildung der Haarfollikel kommt es zu einer komplexen Interaktion von dermalen und epidermalen Zellen, die über ein Netzwerk unterschiedlichster Faktoren reguliert wird (Schneider et al., 2009).

Der sich regelmäßig wiederholende Haarzyklus lässt sich in 3 Phasen unterteilen (Abb. 6). In der anagenen Phase (Wachstumsphase) kommt es zu einer massiven epithelialen Proliferation und Differenzierung. In der katagenen Phase (Übergangsphase) stellen die Keratinozyten der Haarmatrix des Bulbus die Proliferation ein und der Haarfollikel wird übergangsweise zurückgebildet. In der telogenen Phase (Endphase) erneuert sich die dermale Papille und der Haarfollikel regeneriert. Die Phasen lassen sich morphologisch weiter unterteilen. Diese Unterteilungen werden anhand von römischen Ziffern, die an die jeweilige Bezeichnung der Phase angehängt werden, benannt. Die Haarzyklen der einzelnen Haarfollikel des Menschen verlaufen asynchron. Im Gegensatz dazu gibt es bei vielen Tieren zusätzlich einen synchronen Zyklus, der eine Anpassung an die jahreszeitlichen Schwankungen der Umgebungstemperatur ermöglicht.

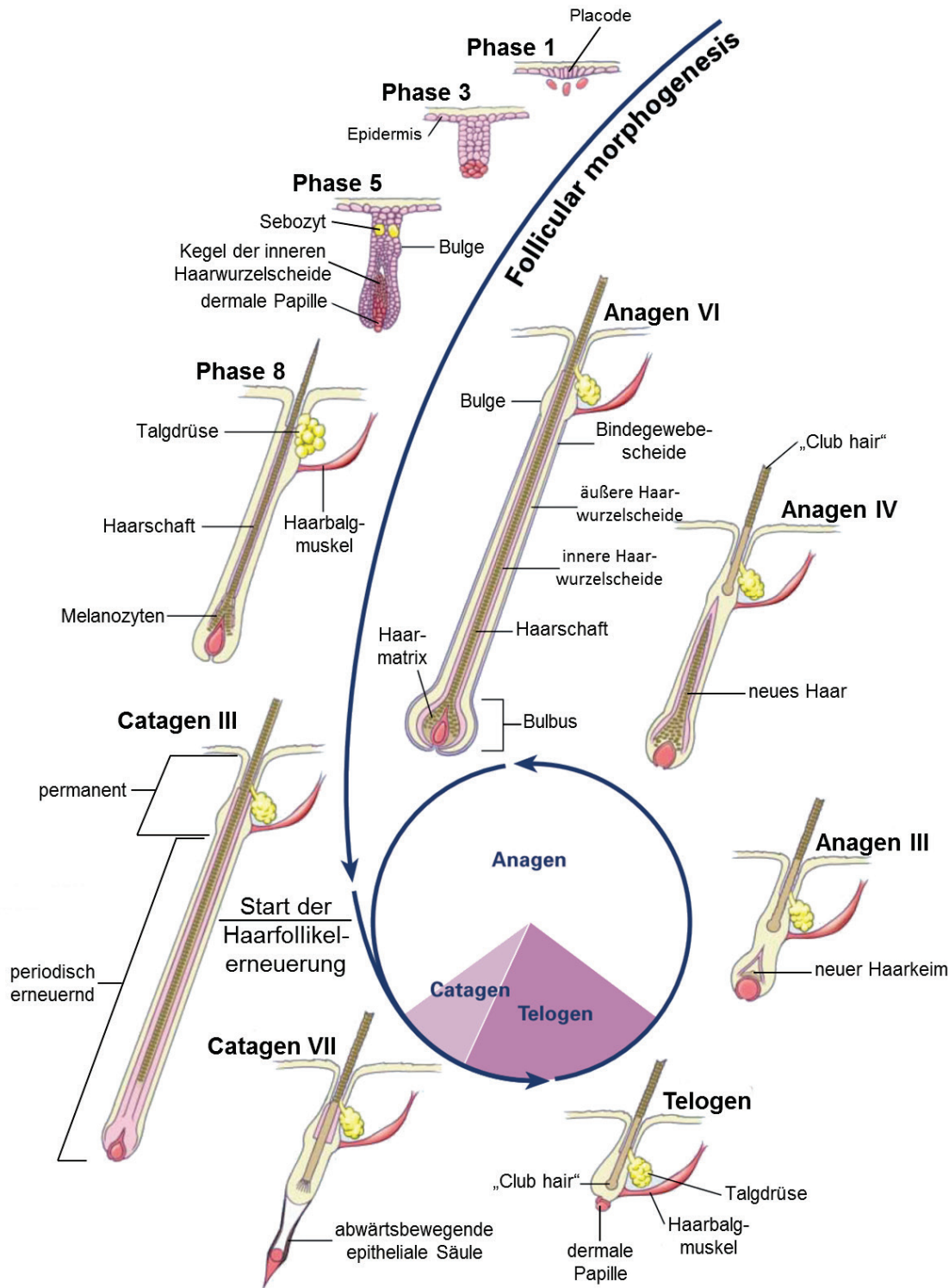


Abb. 6: Die Haarentwicklung und der Haarzyklus. Der obere Teil gibt die follikuläre Entwicklung des Haares wieder, diese wird - obwohl es sich um einen kontinuierlichen Prozess handelt - nach Hardy in acht Phasen eingeteilt, von denen hier vier dargestellt sind. Der Haarzyklus selbst wird in drei Phasen eingeteilt. Die Wachstumsphase (anagene Phase), die Übergangsphase (katagene Phase) und die Endphase (telogene Phase). Diese lassen sich anhand von morphologischen Veränderungen noch weiter unterteilen. Diese Unterteilungen sind hier beispielhaft anhand der römischen Ziffern dargestellt. Das Tortendiagramm gibt den zeitlichen Anteil der jeweiligen Phase am Haarzyklus wieder. (modifiziert nach (Paus und Cotsarelis, 1999) und (Schneider et al., 2009), Einteilung der unterschiedlichen morphologischen Entwicklungsphasen nach (Hardy, 1992))

1.2.4.1 Haare und die Barriere

Die Haut stellt die Barriere des Körpers da. Dabei ist die Epidermis der wichtigste Anteil dieser Barriere. Durch die ca. 5 Millionen den Körper bedeckenden Haare wird diese Barriere unterbrochen. Die Haare durchlöchern die Barriere nicht nur, sondern sie sind mit ihren Follikeln auch tief in den Strukturen der Dermis bzw. Subkutis verankert. Die durchschnittliche Länge des terminalen Haarfollikels beträgt $3864 \pm 605 \mu\text{m}$ (Blume-Peytavi und Vogt, 2011; Vogt et al., 2007). Damit bildet das Haar aufgrund seiner Struktur, ebenso wie die Drüsen der Haut, Eintrittspforten für Mikroorganismen.

Neben der Epidermis ist auch der Haarfollikel ein Biotop für unterschiedliche Kommensalen. So kommen neben Haarbalmilben (*Demodex folliculorum*, *Demodex brevis*) (Hay, 2010) auch Bakterien (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*) (Paus et al., 1999) und Hefepilze (*Malassezia furfur*) in unterschiedlichen Bereichen der Haarwurzel vor (Lange-Asschenfeldt et al., 2011). Der Haarfollikel ist in der anagenen Phase ebenso wie der Nagel, der Glaskörper des Auges und das zentrale Nervensystem ein sogenanntes immunprivilegiertes Gewebe (Ito et al., 2008).

Immunprivilegierte Gewebe zeichnen sich durch mehrere Besonderheiten aus. Dazu zählen eine sehr geringe Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes MHC Ia, eine lokal erhöhte Produktion von potenten immunsuppressiven Substanzen, eine Störung in der Funktion antigenpräsentierender Zellen, das Fehlen lymphatischer Strukturen, die Ausbildung von Barrieren in der extrazellulären Matrix zur Inhibition der Einwanderung von Immunzellen, die Expression des Fas Liganden und eine Inhibition der Aktivität natürlicher Killerzellen (Ito et al., 2008). Damit bedarf der Haarfollikel als Teil einer mit der Umgebung in direktem Kontakt stehenden Grenzfläche einer besonderen Ausstattung an nicht zellvermittelten Immunitätsfaktoren. Teil dieser humoralen Immunität können antimikrobielle Peptide oder antimikrobiell aktive Lipide oder die Kombination dieser und weiterer Faktoren sein. Zu dem Einfluss der antimikrobiellen Peptide hBD-1 und hBD-2 (Chronnell et al., 2001) sowie Psoriasin und RNase 7 (Reithmayer et al., 2009) im Haar wurden bereits erste Untersuchungen durchgeführt.

1.3 Epidermale Differenzierung

In der Epidermis, der Haarwurzel, der Talgdrüse und der Schweißdrüse spielt die Differenzierung der Keratinozyten eine zentrale Rolle für die Ausbildung der Barriere, des Haares und der Drüsen (Fuchs und Horsley, 2008). In der Epidermis werden dabei vier

morphologisch differenzierbare Schichten durchlaufen: das Stratum basale, das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum (Abb. 1).

In der „Bulge“-Region der Haarwurzel sind die Stammzellen der Haarwurzel lokalisiert, die im Haarzyklus die neue dermale Papille formen (Abb. 6). Im Stratum basale sind einzelne interfollikuläre epidermale Stammzellen zu finden. Diese befinden sich ebenso wie die restlichen Zellen des Stratum basale in direktem Kontakt mit der extrazellulären Basallamina, die die Trennschicht zwischen Dermis und Epidermis darstellt. Sobald die Zellen des Stratum basale aufgrund der Proliferation den Kontakt zur Basallamina verlieren, geht die Fähigkeit der Proliferation verloren und die Differenzierung wird eingeleitet (Eckert et al., 1997; Fuchs und Byrne, 1994; Segre, 2003).

Das Stratum spinosum besteht aus 4 bis 10 Zellschichten von polygonalen Keratinozyten. Die Keratinozyten zeichnen sich dadurch aus, dass sie keinen Kontakt mehr zur Basallamina haben und an vermehrt gebildeten Desmosomen zusammen hängen. Der Name Stratum spinosum, im Deutschen auch Stachelzellschicht, erklärt sich aus einem Artefakt während der histologischen Präparation. Dabei kommt es zu einer Schrumpfung der Mikrofilamente, die dann zu dem stacheligen Aussehen im lichtmikroskopischen Bild führt.

Im Stratum granulosum kommt es zu einer verstärkten Synthese von Proteinen und Lipiden. Dabei werden Filaggrin und Trichohyalin in zytoplasmatische Keratohyalin-Granula eingelagert (Manabe und O'Guin, 1992) und Lipide, Enzyme und weitere Proteine in lamellierten Granula, die als Membran-umhüllte verzweigte Strukturen aus dem trans-Golgi-Netzwerk hervorgehen, gespeichert (Ishida-Yamamoto et al., 2004).

Im Stratum corneum sind die Keratinozyten abgestorben. Dabei bildet sich zwischen der verhornten Zellhülle, dem sogenannten „cornified envelope“, eine lipidreiche extrazelluläre Matrix sowie miteinander verbundene Korneodesmosomen („brick and mortar“-Modell (Nemes und Steinert, 1999)). Die Zellkerne und die Organellen sind nicht mehr vorhanden (Candi et al., 2005; Yamamoto-Tanaka et al., 2014). Die abgestorbenen Keratinozyten werden auch Korneozyten genannt und bilden zusammen mit der extrazellulären Matrix als eine Einheit den primären Schutz der Haut gegen äußere Einflüsse. Sie werden im Prozess der Desquamation, der Abschuppung der obersten Schichten, durch immer neue ausdifferenzierte Zellen ersetzt.

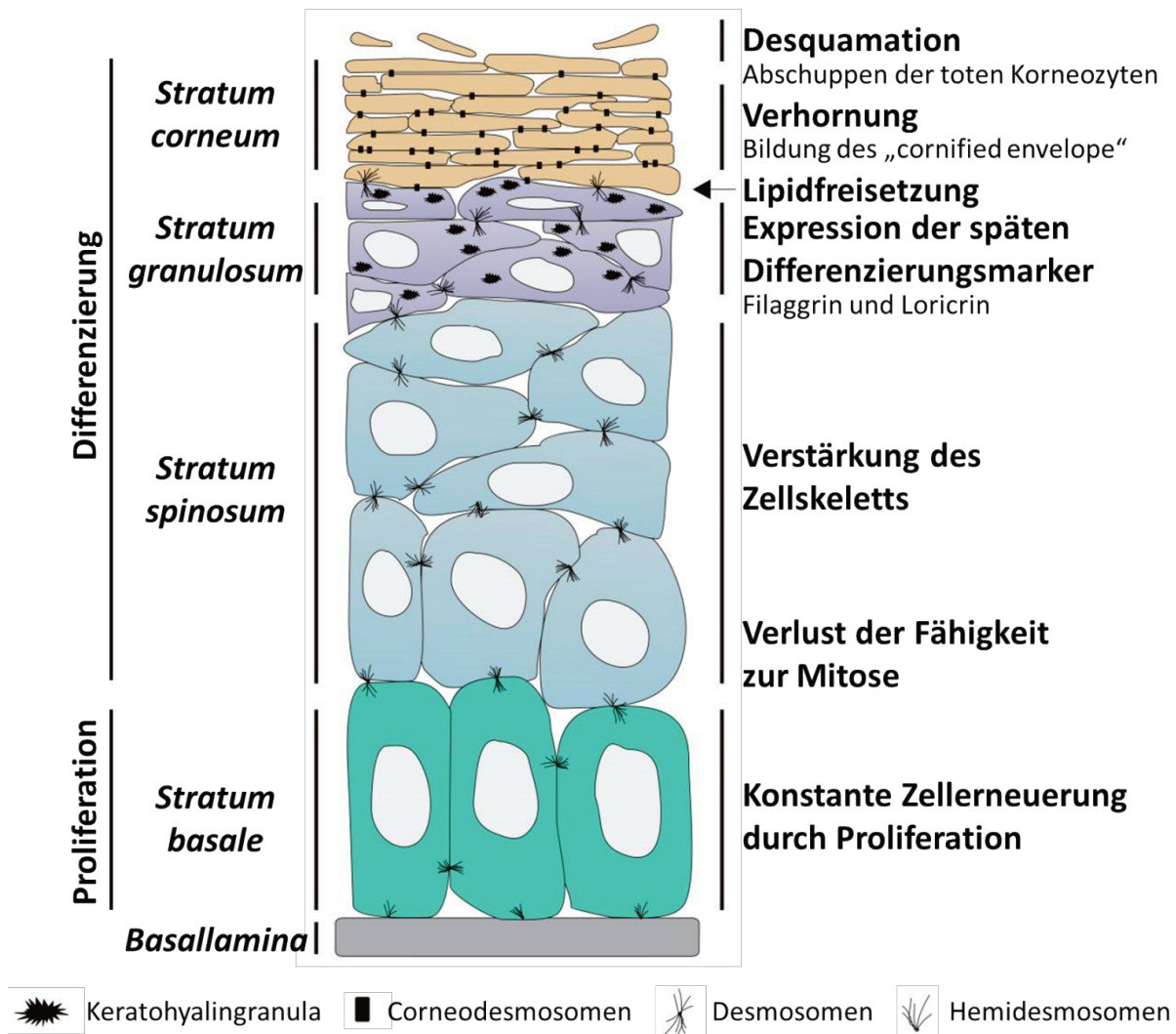


Abb. 7: Epidermale Differenzierung. Das Stratum basale enthält die proliferierenden Keratinozyten, die über Hemidesmosomen mit der Basallamina verbunden sind. Sobald aufgrund der Proliferation die Verbindung zur Basallamina verloren geht, verlassen die Keratinozyten den Zellzyklus und starten das Programm der terminalen Differenzierung – den Prozess der Verhornung. Im Stratum spinosum wird das Netzwerk aus Keratinfilamenten verstärkt und benachbarte Zellen werden durch Zell-Zell-Verbindungen, die Desmosomen, miteinander verbunden. Im Stratum granulosum flachen die Zellen weiter ab und Proteine, wie das Profilaggrin oder das Loricrin werden exprimiert, die in Form der sichtbaren Keratohyalingranula gespeichert werden. Zusätzlich werden Lipide produziert, die in den „lamellar bodies“ gelagert werden. Weiterhin werden Proteine verbrückt und bilden unterhalb der Plasmamembran den „cornified envelope“. Die „lamellar bodies“ werden am Übergang zum Stratum corneum freigesetzt und bilden eine wasserabweisende Hülle um den cornified envelope. Abschließend werden die Zellen im Prozeß der Desquamation abgeschuppt. (modifiziert nach (Denecker et al., 2008))

Ein Keratinozyt durchläuft den Zyklus von der Teilung im Stratum basale bis hin zur Ausdifferenzierung und Desquamation in etwa einem Monat (Houben et al., 2007). Die Ausdifferenzierung und Verhornung stellt eine spezielle Art des programmierten Zelltodes dar (Eckhart et al., 2013; Lippens et al., 2009). Die Zellen verändern ihre Protein-Expression und synthetisieren anstatt der für das Stratum basale typischen Keratine K5 und K14 (Byrne et al., 1994) die für das Stratum spinosum und nachfolgende Zellschichten charakteristischen Keratine K1 und K10 (Fuchs und Green, 1980). Im Stratum granulosum werden vermehrt

Proteine exprimiert, die als Differenzierungsmarker verwendet werden, unter anderem Involucrin, Loricrin und Filaggrin (Eckert et al., 1997; Takahashi et al., 2000). Diese Proteine sind auch entscheidend für die Ausbildung der verhornten Zellen und deren Hüllen, dem „Cornified Cell Envelope“ (Candi et al., 2005). Loricrin, das in sogenannten L-Keratothyalin-Granula in der Zelle vorkommt, und Involucrin sind durch kovalente Verknüpfungen unter Beteiligung von Transglutaminasen am Aufbau des „Cornified Cell Envelope“ beteiligt (Eckert et al., 2005a; Hitomi, 2005). Das unlösliche Polyprotein Profilaggrin wird in sogenannten F-Keratothyalin-Granula gelagert und während der Differenzierung dephosphoryliert und proteolytisch in die monomeren Filaggrin-Einheiten sowie einen Amino- und Carboxy-terminalen Teil gespalten (O'Regan und Irvine, 2008). Diese Untereinheiten interagieren mit den Keratinfilamenten der Zellen, was zu einem Kollaps des Keratin-Netzwerks führt und die Abflachung der Zellform bedingt (Dale et al., 1997). Während der Differenzierung spielen Transglutaminasen als auch Proteasen und Proteaseinhibitoren eine entscheidende Rolle (Zeeuwen, 2004). Der epidermale Ca^{2+} -Gradient scheint als einer der Auslöser der terminalen Differenzierung eine Schlüsselrolle einzunehmen (Bikle et al., 2012). In der Epidermis ist die Ca^{2+} -Konzentration im Stratum basale niedrig und steigt bis zum Stratum granulosum hin an. Im Stratum corneum kann kaum noch freies Ca^{2+} detektiert werden (Menon et al., 1985). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten, die in Medien mit einer Ca^{2+} -Konzentration unter 30 μM kultiviert werden, die Differenzierungsmarker Profilaggrin und Loricrin kaum exprimieren. Eine Kultivierung dieser Zellen in Medium mit einer Ca^{2+} -Konzentration über 100 μM führte dagegen zu einem Anstieg der Expression solcher Differenzierungsmarker (Bikle et al., 2004).

1.3.1 Der epidermale „cornified envelope“

Der „cornified envelope“, besteht aus einer unlöslichen Proteinstruktur die als Gerüst für daran gebundene Lipide fungiert und in dieser Kombination die Plasmamembran des Keratinozyten ersetzt (Abb. 8).

Im Stratum spinosum beginnt die Ausbildung des „cornified envelope“ mit der Synthese spezifischer Strukturproteine (Loricrin, Keratin K1 und K10, Profilaggrin und den Small Proline-Rich (SPR)-Proteinen) und der Synthese spezifischer Lipide und deren Freisetzung in den interzellulären Raum.

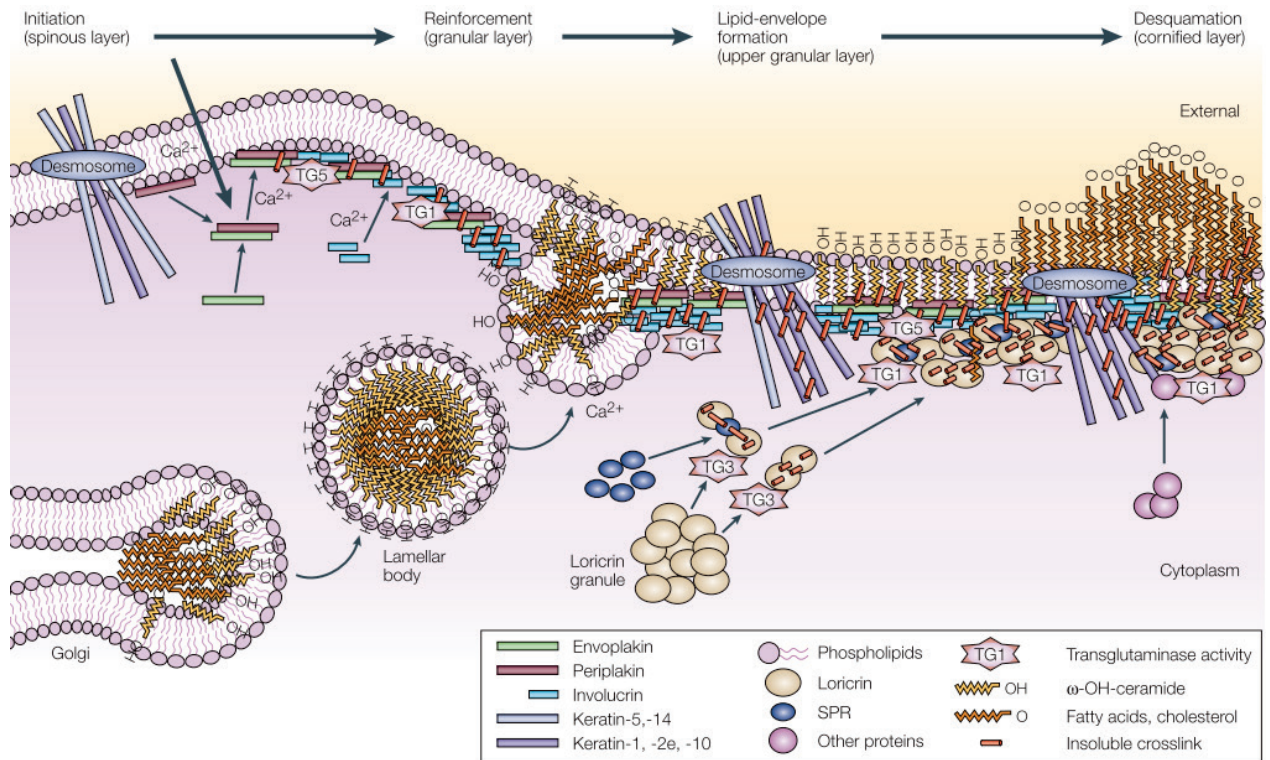


Abb. 8: Bildung des „cornified envelope“. Die verhornte Zellohülle ist die unlösliche Proteinschicht, die in Korneozyten die Plasmamembran ersetzt und als Grundgerüst für die extrazelluläre Lipidschicht dient. In der Abbildung ist eine Übersicht dieses Prozesses im zeitlichen Verlauf von links nach rechts anhand der Zellmembran dargestellt. Die Bildung dieser Struktur wird im Stratum spinosum durch die Expression von Proteinen sowie die Synthese und Freisetzung von Lipiden in den Interzellularraum initiiert. Transglutaminase (TG) 1 und TG5 vernetzen Envoplakin und Periplakin unterhalb der Zellmembran und verbinden sie dabei mit den Desmosomen. In der zweiten der Verstärkungsphase, die im Stratum granulosum erfolgt, werden Lipide kovalent mit den „cornified envelope“-Proteinen verbunden; Loricrin wird durch TG3 und TG1 mit den „small proline-rich proteins“ (SPRs) verknüpft und die Desmosomen werden intensiv als Substrat für Transglutaminierungen genutzt. Lipide aus den „lamellar bodies“, die aus dem Golgi-Apparat kommen, werden durch TG5 und TG1 mit den bereits vernetzten Proteinen verbunden. Im letzten Schritt vor der Desquamation, kommt es zu weiteren Vernetzungen durch TG1 und die Freisetzung von ω -OH-Ceramiden, Fettsäuren und Cholesterol. Im letzten Schritt lösen sich die toten Zellen von den darunter liegenden Zellen ab. (entnommen aus (Candi et al., 2005))

Gleichzeitig verändert sich die Struktur und Zusammensetzung der Desmosomen. Im Stratum basale und im Stratum spinosum bilden Plakoglobin, Desmoplakin und Plakophilin hauptsächlich die intrazellulären Plaques, die über die zu den Cadherinen gehörenden Adhäsionsproteine Desmocollin 2 und 3 sowie Desmoglein 2 und 3 mit den Nachbarzellen verbunden sind. Während der weiteren Differenzierung werden Envoplakin und Periplakin in die intrazellulären Plaques eingelagert und im weiteren Verlauf kovalent verknüpft. Dabei sind die Zellen extrazellulär ausschließlich durch Desmocollin 1 und Desmoglein 1 miteinander verbunden. Zusätzlich wird diese Zell-Zell-Verbindung durch das Glykoprotein Corneodesmosin extrazellulär verstärkt (Candi et al., 2005; Egelrud, 2000). Die Degradation dieser nun Corneodesmosomen genannten Zell-Zell-Kontakte trägt im Wesentlichen zur Desquamation bei (Chapman und Walsh, 1990). Loricrin, mit 70-85 % Hauptproteinbestandteil

der Epidermis, wird durch die Transglutaminasen 1, 3 und 5 mit sich selbst den SPR-Proteinen und einer großen Anzahl weiterer Proteine vernetzt und an den Korneodesmosomen verankert (Eckert et al., 2005b; Hitomi, 2005). Lipide, die in Lamellarkörperchen synthetisiert wurden, werden durch Fusion dieser Lamellarkörper mit der Zytoplasmamembran in den extrazellulären Raum abgegeben und tragen so zu der Ausbildung einer äußeren Lipidhülle bei (Madison, 2003). Hauptsächlichste Bestandteile dieser Lipidmatrix sind vor allem ω -OH-Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren (Weerheim und Poncet, 2001). Im Stratum granulosum werden diese kovalent extrazellulär an bereits verknüpfte „cornified envelope“-Proteine, vor allem Involucrin, gebunden (Nemes et al., 1999). Im Stratum corneum schließlich ist die Plasmamembran der Zelle vollständig ersetzt durch vernetzte Proteine auf der zytosolischen Seite und durch die Lipidmatrix auf der extrazellulären Seite (Candi et al., 2005).

1.3.2 Der epidermale Differenzierungskomplex (EDC)

Viele der Proteine, die während der Differenzierung exprimiert werden, sind in der Region 1q21.3 des humanen Chromosoms 1 lokalisiert. Dieser Gencluster wird deshalb als epidermaler Differenzierungskomplex bezeichnet und umfasst eine Region von 1,9 bis 2,0 Mb (Marenholz et al., 2001; Mischke et al., 1996). Die kodierenden Sequenzen der Proteine können drei Genfamilien zugeordnet werden: den „Cornified Envelope Precursor“-Proteinen, den S100A-Proteinen und den „S100 Fused Type“-Proteinen. Die „Cornified Envelope Precursor“-Proteine können noch in die Unterfamilien Involucrin und Loricrin, die „Small Proline-Rich“ (SPR)-Proteine und die „Late Cornified Envelope“ (LCE)-Proteine unterteilt werden (Kypriotou et al., 2012).

1.3.3 Die „S100 Fused Type“-Proteine (SFTPs)

Die „S100 Fused Type“-Proteine bestehen aus einer Amino-terminalen Domäne, die homolog zu den S100A-Proteinen ist. Darauf folgt eine große zentrale Domäne, die aus mehreren Tandem-Wiederholungen einer oder mehrerer Sequenzen besteht und Ähnlichkeiten zu den „Cornified Cell Envelope Precursor“-Proteinen aufweist. Am Ende folgt eine Carboxy-terminalen Domäne (Henry et al., 2012; Kypriotou et al., 2012).

Zur Gruppe der S100A-Proteine gehören 17 Mitglieder, unter anderem das Psoriasin (S100A7), das Calprotectin (S100A8/A9) und das Koebnerisin (S100A15). Charakteristisch für diese Proteine sind zwei EF-Hand- Ca^{2+} -Bindungsdomänen, die durch eine sogenannte „hinge“-

Region getrennt und durch Amino- und Carboxy-terminale Domänen flankiert werden (Eckert et al., 2004).

Die „Cornified Envelope Precursor“-Proteine, zu denen die Gruppe der „Small Proline-Rich“-Proteine sowie Involucrin und Loricrin gehören, zeichnen sich durch eine unterschiedliche Anzahl an Tandem-Wiederholungen aus (Cabral et al., 2001).

Diese Merkmale der S100A-Proteine und der SPRR-Proteine sind in der Sequenz der „S100 Fused Type“-Proteine „fusioniert“ (Markova et al., 1993; Presland et al., 1992; Volz et al., 1993). Zur Familie der humanen „S100 Fused Type“-Proteine gehören Trichohyalin-like1, Trichohyalin, Repetin, Hornerin, Profilaggrin, Filaggrin-2 und Cornulin (Wu, 2005).

Trichohyalin wird hauptsächlich in Haarfollikelzellen der inneren Wurzelscheide, aber auch in Zellen des Nagelbetts, in den filiformen Papillen der Zunge und eingeschränkt in der Epidermis in sogenannten Trichohyalin-Granula exprimiert (Hamilton et al., 1991; Rothnagel und Rogers, 1986). Als Substrat von Transglutaminasen wird Trichohyalin vermutlich zur mechanischen Verstärkung der jeweiligen Strukturen kovalent über Isopeptid-Bindungen an Keratine im Haar oder an verschiedene Proteine des „Cornified Cell Envelope“ in der Epidermis und anderen Epithelien gebunden (Lee et al., 1993; Steinert et al., 2003).

Das Repetin wurde zuerst in der Maus beschrieben. Die Repetin-mRNA wurde vor allem in der Zunge und im Vormagen und nur gering in der Haut detektiert (Krieg et al., 1997). Das murine Protein wird im „Cornified Cell Envelope“ der inneren Haarwurzelscheide mit Trichohyalin verknüpft (Steinert et al., 2003). Das humane Repetin konnte hauptsächlich in der Zunge, inneren Haarwurzelscheide und fokal auch in der Epidermis nachgewiesen werden. Repetin ist vermutlich mit Keratohyalin-Granula assoziiert (Huber et al., 2005).

Hornerin wurde ebenfalls zuerst in der Maus beschrieben. Die Expression beschränkt sich hier auf das Stratum granulosum und Stratum corneum der Epidermis, die Zunge, den Ösophagus und hauptsächlich den Vormagen, wo sowohl mRNA als auch Protein detektiert wurden (Makino et al., 2001; Makino et al., 2003). Dabei kommt das murine Hornerin genau wie das murine Profilaggrin in den Keratohyalin-Granula vor (Makino et al., 2003). Humanes Hornerin wurde anfänglich nur in psoriatischen Läsionen und regenerierender Epidermis nachgewiesen (Takaishi et al., 2005). Durch unsere Arbeitsgruppe wurde eine Protein-Expression im Stratum granulosum und Stratum corneum gesunder Haut nachgewiesen, wohingegen die Expression in läsionaler Haut der Psoriasis und der Atopischen Dermatitis verringert war (Wu et al.,

2009b). Darüber hinaus wurde Hornerin auch in der äußeren Haarwurzelscheide detektiert (Wu et al., 2009b).

In einer weiteren Untersuchung ließ sich mit einem Antipeptidantikörper in Epidermisextrakten Hornerin-spezifische Immunreaktivität nachweisen (Henry et al., 2011). Diese konnte in der Peripherie der Keratohyalin Granula in den Keratinozyten der oberen Schichten des Stratum granulosum und entlang der Peripherie des „cornified envelope“ der Korneozyten im Stratum corneum lokalisiert werden. Hornerin wurde *in vitro* als Substrat für die Bildung von Nε-(γ-glutamyl)lysin-Bindungen durch Transglutaminase 3 identifiziert (Henry et al., 2011).

Bei einer Proteomanalyse wurde Hornerin auch in Blutplättchen gefunden (Egidi et al., 2011). Des Weiteren ergaben zwei Untersuchungen eine Assoziation von Hornerin mit Tumoren (Fleming et al., 2010; Wang et al., 2006). Fleming *et al.* konnten Hornerin in Zellen des Brustepithels sowie Fibroblasten und Makrophagen nachweisen (Fleming et al., 2012).

Eine neuere Untersuchung beschreibt eine Korrelation zwischen der Hornerin-Protein-Expression und dem Auftreten von Atopischer Dermatitis (Pellerin et al., 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl in läsionaler als auch in nicht-läsionaler Haut von Patienten mit Atopischer Dermatitis das Hornerin-Protein stark reduziert oder nicht zu detektieren war.

Filaggrin bzw. Profilaggrin ist neben Trichohyalin das am längsten bekannte Mitglied der „S100 Fused Type“-Protein-Familie (Dale und Ling, 1979). Es wird als unlösliches und phosphoryliertes Proprotein exprimiert (Resing et al., 1995) und in den sogenannten F-Keratohyalin-Granula gelagert (Steven et al., 1990). Das Profilaggrin wird durch Prozessierung in die funktionellen Filaggrin-Untereinheiten gespalten. Diese werden anschließend im Stratum corneum zu kleineren Einheiten weiter prozessiert und dienen der Haut als sogenannte „natural moisturizing factors“, natürliche Feuchtigkeitsspeicher (Harding, 2004; Rawlings und Harding, 2004). Diese Prozessierung wird durch eine Dephosphorylierung eingeleitet (Kam et al., 1993) und durch verschiedene Proteasen wie Furin (Pearton et al., 2001), Matriptase (List et al., 2003), Proctasin (Netzel-Arnett et al., 2006), Calpain I (Resing et al., 1993) und Caspase 14 (Raymond et al., 2007) vermittelt. Das Profilaggrin-Protein ist in der Epidermis im Stratum granulosum und Stratum corneum, ebenso wie im Ösophagus und in der Zunge exprimiert (Makino et al., 2003). Die Filaggrin-Untereinheiten sind in der Lage, Keratinfilamente zu bündeln (Steinert et al., 1981). Dies führt zum Kollaps des Zytoskeletts und begünstigt die Ausbildung der abgeflachten Zellform, die im Stratum corneum für die

Zellen charakteristisch ist (Candi et al., 2005; Dale et al., 1997). Für die weitere Prozessierung scheint eine Citrullinierung durch Protein-Arginin Deiminasen entscheidend zu sein (Harding und Scott, 1983; Nachat et al., 2005; Senshu et al., 1996).

Mutationen des Filaggrin-Gens oder Mutationen in Genen, deren Proteine an der korrekten Prozessierung des Profilaggrins beteiligt sind, werden mit verschiedenen chronisch entzündlichen Hautkrankheiten assoziiert, wie z. B. mit Atopischer Dermatitis und Ichthyosis vulgaris (Ellinghaus et al., 2013; Hoffjan und Stemmler, 2007).

Cornulin (C1orf10) wurde initial als mit dem ösophagealen Plattenepithelzellkarzinom assoziiert beschrieben (Xu et al., 2000). Die Assoziation mit Karzinomen wurde in weiteren Studien bestätigt (Imai et al., 2005; Pawar et al., 2013; Schaaij-Visser et al., 2010; Yagui-Beltran et al., 2001; Zhang et al., 2009). Das Protein konnte im Stratum granulosum und den unteren Schichten des Stratum corneum, in der inneren Haarwurzelscheide und in Keratinozyten nachgewiesen werden (Contzler et al., 2005). Eine Analyse der kodierenden Sequenz für SEP53, ein anderer Name für Cornulin, zwischen 9 verschiedenen Säugetierspezies zeigt eine schnelle Evolution dieses Gens durch positive Selektion. Diese Form der Selektion tritt nur bei Genen die an der Fortpflanzung oder bei Genen des Immunsystem, die am "Rüstungswettlauf" von Adaption und Gegenadaption mit Pathogenen und Parasiten beteiligt sind, auf. Da Cornulin hauptsächlich in Epithelien exprimiert wird, ist eine Beteiligung an der angeborenen Immunabwehr wahrscheinlich (Little et al., 2007).

Filaggrin-2 (auch Ifapsoriasin genannt) wurde als Mitglied der „S100 Fused Type“-Protein-Familie identifiziert. Auf mRNA-Ebene konnte eine Expression in Haut (Wu, 2005), Thymus, Magen, Tonsillen, Plazenta und Hoden nachgewiesen werden (Wu et al., 2009a). In Keratinozyten konnte durch eine Behandlung mit Ca^{2+} -Ionen eine zeitabhängige Erhöhung der Filaggrin-2 mRNA-Expression gezeigt werden (Wu et al., 2009a). Im Rahmen einer Expressionsstudie, in der Gene untersucht wurden, die an der epidermalen Differenzierung beteiligt sind, wurde Filaggrin-2 als ausschließlich in granulären Keratinozyten exprimiert nachgewiesen (Toulza et al., 2007). Eine Expression des Proteins konnte in Keratinozyten des Stratum granulosum und Stratum corneum (Wu et al., 2009a) sowie ekkrinen Schweißdrüsen und deren Ausführungsgängen gezeigt werden (Hansmann, 2009). Der Amino-terminale Spacer zeigt eine schwache antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* und Pseudomonaden. Der Carboxy-terminale Teil zeigt eine geringe Antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* sowie eine sehr gute antimikrobielle Aktivität gegen Pseudomonaden (Hansmann, 2009).

1.3.4 Die Immunabwehr der Haut des Menschen

Das angeborene Immunsystem der Haut besteht aus fünf Elementen: erstens einer physikalischen Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen und der Abwehr physikalischer Gefahren, zweitens einem grundlegenden chemischen Schutzschild, der das mikrobielle Wachstum und das aktive Eindringen verhindert, drittens einem System zur Erkennung von eingedrungenen gewebefremden Mikroorganismen, viertens einer induzierbaren antimikrobiellen Antwort, ausgelöst durch das Erkennungssystem und fünftens einer Verstärkung und Anpassung der Abwehr durch die Einbeziehung der zellulären angeborenen Immunität (Gallo und Nizet, 2008).

Die Struktur und der Aufbau des Stratum corneums bildet die physikalische Barriere, die bei ihrer Unversehrtheit das Eindringen von potenziellen Pathogenen nahezu ausschließt. Die verhornten und abgestorbenen Keratinozyten des Stratum corneums sind über Korneodesmosomen miteinander verbunden und von einer Lipidmatrix umgeben, die den Zusammenhalt dieser Zellschicht verstärken. Zusätzlich tragen auch die regelmäßige Abschuppung und die damit einhergehende Erneuerung der Korneozyten des Stratum corneums dazu bei, dass die Anzahl der Mikroorganismen auf der Haut relativ konstant bleibt. Neben dieser „physikalischen Barriere“ besitzt die Haut eine weitere, die sogenannte „chemische Barriere“ (Boman, 2000; Schröder und Harder, 2006). Dazu gehört der sogenannte Säureschutzmantel, bei dem die Hautoberfläche einen sauren pH-Wert von ca. 5,5 generiert (Schmid-Wendtner und Korting, 2006), der das Wachstum vieler Bakterien reduziert bzw. hemmt, antimikrobiell wirksame Lipide (Bratt et al., 2011; Drake et al., 2008) sowie antimikrobiell und antiviral wirksame Peptide und Proteine (Gläser et al., 2005; Harder et al., 1997; Harder und Schröder, 2002). Diese Moleküle stellen einen Teil der angeborenen Immunabwehr dar und sind gegen ein breites Spektrum an Organismen wirksam. Zudem verbinden sie mit zusätzlichen Funktionen das angeborene und adaptive Immunsystem; so besitzen einige antimikrobielle Proteine eine chemotaktische Wirkung auf Zellen des adaptiven Immunsystems und weitere immunmodulatorische Eigenschaften (Harder et al., 2007).

Antimikrobielle Proteine der Haut sind unter anderem die humanen β -Defensine hBD-1, hBD-2, hBD-3 und hBD-4, das Cathelicidin LL-37, die Ribonuklease RNase 7, verschiedene S100-Proteine wie Psoriasin (S100A7) und Calprotectin (S100A8/A9), Lysozym und Antileukoprotease (Harder et al., 2007). Diese antimikrobiellen Proteine sind zum Teil in

gesunder Haut konstitutiv exprimiert wie z. B. RNase 7 oder durch Mikroorganismen induzierbar wie z. B. hBD-2.

Das angeborene Immunsystem, das auch Pflanzen und niedere mehrzellige Organismen besitzen, wird als ursprünglicher und phylogenetisch älter angesehen als das adaptive Immunsystem, welches ausschließlich Wirbeltiere besitzen (Murphy, 2012; Schröder, 1999).

Das angeborene Immunsystem erkennt hauptsächlich konservierte Strukturen von Mikroorganismen, die der eigene Organismus nicht besitzt, wie z. B. Lipopolysaccharide, Flagellin, bestimmte Oberflächenmoleküle von Mikroorganismen, unmethylierte DNA oder dsRNA. Durch diese Einschränkung, nur konservierte Bereiche von Pathogenen erkennen zu können, wird das angeborene Immunsystem als wenig variabel angesehen. Somit unterscheidet sich die adaptive Immunantwort von der angeborenen Immunantwort in der Fähigkeit Strukturen zu erkennen, die spezifisch für spezielle Stämme oder Varianten von Mikroorganismen sind. Dagegen ist das angeborene Immunsystem aber in der Lage, die körperfremden Strukturen und damit auch die Mikroorganismen schnell (innerhalb weniger Stunden) zu bekämpfen, und ist sofort verfügbar. Zum angeborenen Immunsystem werden z. B. das Komplementsystem, „Toll like“-Rezeptoren, Granulozyten, Makrophagen, „Natural Killer“-Zellen, verschiedene Lipide und antimikrobielle Proteine gezählt (Gallo und Nizet, 2008; Harder et al., 2007; Murphy, 2012).

Soweit bisher bekannt, ist im Gegensatz zur angeborenen Immunität die Immunantwort des adaptiven Immunsystems hochvariabel, anpassungsfähig und besitzt ein sogenanntes „immunologisches Gedächtnis“, d. h. es ist in der Lage, bekannte Pathogene bzw. assoziierte Moleküle wiederzuerkennen und zu bekämpfen. Die Immunantwort des adaptiven Immunsystems benötigt hier allerdings wesentlich länger (>96 h) als die des angeborenen Immunsystems. Die Haupteffektorzellen des adaptiven Immunsystems sind hierbei B- und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten sekretieren nach Aktivierung und Differenzierung in eine Plasma-Zelle spezifische Antikörper, die über die Blutbahn im Körper verteilt werden und Pathogene erkennen. Diese mit Antikörpern markierten Strukturen werden wiederum von Phagozyten anhand spezifischer Rezeptoren erkannt und Pathogene können phagozytiert werden. T-Lymphozyten werden unterteilt in zytotoxische T-Zellen, die Zellen eliminieren, welche von intrazellulären Erregern befallen sind, T-Helfer-Zellen, die Makrophagen und vor allem B-Zellen aktivieren können, und regulatorische T-Zellen, die an der Regulation und Modulation des Immunsystems beteiligt sind (Murphy, 2012).

Das angeborene Immunsystem ist das entwicklungsbiologisch ältere System. Auf diesem System aufbauend hat sich in den Wirbeltieren das adaptive Immunsystem entwickelt (Cooper und Alder, 2006). Die sich daraus ergebende Abhängigkeit der beiden Systeme voneinander ist bei den Makrophagen, als Bestandteil des angeborenen Immunsystems, und den dendritischen Zellen, die eine Art Bindeglied zwischen den beiden Systemen darstellen, zu erkennen. So erkennen Makrophagen und dendritische Zellen Mikroorganismen an konservierten Strukturen, sind dann aber als Bestandteil des adaptiven Immunsystems in der Lage, T- und B-Zellen zu aktivieren (Murphy, 2012). Das aus Plasmaproteinen aufgebaute Komplementsystem kann direkt durch die Bindung an die Oberflächen von Mikroorganismen oder indirekt durch an Mikroorganismen gebundene Antikörper aktiviert werden. Dabei wird eine Kaskade von Reaktionen direkt auf der Oberfläche der Mikroorganismen in Gang gesetzt, die zur Generierung aktiver Komponenten mit unterschiedlichen Effektorfunktionen führen. Zu diesen Effektorfunktionen gehören die Rekrutierung von Phagozyten und die Bildung von Poren, die zu einer Lyse der Mikroorganismen führen. Auch hier sind angeborenes und adaptives Immunsystem miteinander verbunden (Murphy, 2012).

2 Fragestellung bzw. Zielsetzung der Arbeit

In der Dissertation von Zhihong Wu, die sich mit der Charakterisierung des epidermalen Differenzierungskomplexes (EDC) beschäftigte, wurde neben Hornerin und Filaggrin-2 (Ifapsoiasin) auch das Gen für ein weiteres „S100 Fused Type“-Protein (SFTP): das Trichohyalin-like1 gefunden. Neben der Charakterisierung der genetischen Struktur wurde auch die Expression auf mRNA-Ebene untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Erforschung dieses Gens auf Protein-Ebene erfolgen. Dazu sollten initial immunhistologische Untersuchungen der Haut und verschiedener anderer Gewebe durchgeführt werden, um die Lokalisation des Proteins innerhalb des Organismus sowie innerhalb der Gewebe genauer zu bestimmen. Die dafür notwendigen polyklonalen Antikörper sowie die erforderlichen rekombinanten Proteine sollten hergestellt werden. Weiterhin war geplant, das natürliche Protein hinsichtlich Prozessierung und posttranslationaler Modifikationen zu untersuchen. Dieses sollte parallel auch mit den rekombinanten Proteinen durchgeführt werden. Da antimikrobielle Eigenschaften bereits für Fragmente anderer SFTPs nachgewiesen wurden, sollte das natürliche Trichohyalin-like1 und die rekombinanten Proteine ebenfalls hinsichtlich antimikrobieller Aktivität untersucht werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten Studien zur Rolle des Hornerins als Bestandteil der angeborenen Hautabwehr vertieft werden. In ersten Untersuchungen durch Zhihong Wu wurde gezeigt, dass Protein- und Peptidfragmente aus unterschiedlichen repetitiven Einheiten des Hornerins antimikrobielle Aktivität besitzen. Diese Fragmente zeigen im Vergleich mit den bereits bekannten antimikrobiellen Proteinen bzw. Peptiden eine vollkommen andere Zusammensetzung auf Aminosäureebene. Ziel dieser Arbeit war es zu ermitteln, welche Parameter für die antimikrobielle Aktivität verschiedener Hornerinfragmente wichtig sind. Dazu sollte zunächst untersucht werden, welche Aminosäuren für diese Aktivität verantwortlich sind und ob diese Aminosäuren Strukturmerkmale innerhalb des Hornerins bedingen. Außerdem sollte der Einfluss verschiedener physikochemischer Parameter auf die antimikrobielle Aktivität untersucht werden. In einem weiteren Teil der Arbeit sollte der antimikrobielle Wirkmechanismus studiert werden, um mögliche Angriffspunkte bzw. Zielstrukturen in den Mikroorganismen zu identifizieren, über die die antimikrobielle Aktivität des Hornerins vermittelt wird.

3 Material

3.1 Chemikalien

Chemikalien wurden bis auf die folgenden Ausnahmen von Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich inkl. Fluka und Riedel-de Haën (Taufkirchen) oder Merck inkl. Calbiochem (Darmstadt) in der besten verfügbaren Qualität bezogen.

Acros Organics/ Thermo Fisher Scientific (Geel, Belgien) - Iodessigsäureanhydrid, N,N-Dimethyloctylamin, Tetrahydrofuran 99,5 %, Wassergehalt <50 ppm

Bachem (Bubendorf, Schweiz) - Substrate für die Bestimmung von Proteaseaktivitäten

BDH Prolabo/ VWR (Darmstadt) - Acetonitril, 2-Propanol

Bio-Rad (München) - Ammoniumpersulfat, Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung, Bradford Assay Konzentrat

J.T. Baker/ Avantor / Th. Geyer (Hamburg) - Acetonitril, Methanol

LABscan (Gliwice, Polen) - Acetonitril, Methanol

Lonza (Basel, Schweiz) - Agarose (SeaKem LE)

Oxoid /Thermo Fisher Scientific (Wesel) - Sojamehlpepton papainisch verdaut, Todd-Hewitt-Bouillon, YE Hefeextraktpulver

Roche (Mannheim) - „cOmplete, Mini, EDTA-free: Protease Inhibitor Cocktail Tablets“, Triton X-100

Serva (Heidelberg) - Coomassie Brilliant Blau G-250 & R250, Glutaraldehyd-Lösung 25 % in Wasser, Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP)

USB/ Affymetrix (High Wycombe, UK) - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Nonidet P40

3.2 Geräte

Autoklav: Type OS und Laboklav MSL (Webeco, Bad Schwartau) **Blotting:** Trans-Blot SD, Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, München) **Chemilumineszenzdokumentation:** Diana (Raytest, Straubenhardt); FUSION FX7 (peqlab, Erlangen) **DNA-Crosslink:** UV Stratalinker 1800 (Stratagene/ Agilent, Waldbronn) **Dot-Blot Apparatur:** Minifold I (Schleicher & Schuell, Whatman, GE Healthcare, München) **Elektroporation:** Micropulser (Bio-Rad, München) **Fermenter:** LABFORS 3 (Infors HT, Bottmingen/ Basel, Schweiz) **Filtration:** amicon 8400, 8200 und 8010 (Millipore, Schwalbach) **Flüssigchromatographie:** Pump P-1 und Detector UV-1 (Pharmacia/ GE Healthcare); Smart μ HPLC (Pharmacia/ GE Healthcare); ÄKTApurifier (GE Healthcare); Ettan LC (Amersham Biosciences/ GE Healthcare); ÄKTAmicro

(GE Healthcare); Binary HPLC Pump 1525 μ , Photodiode Array Detector 2998, Multi λ Fluorescence Detector 2475, Fraction Collection III (Waters, Eschborn); LC-10AT VP Pumpe, SPD-10A VP UV-VIS Detektor und FCV-10AL VP Mischer (Shimadzu, Duisburg); Pumpe P4000 und Integrator SP4270 (Spectra Physics/ Thermo) **Gasbrenner:** Fireboy S 1000 (Technomara, Wallisellen, Schweiz); gasprofi 1 und gasprofi 1 SCS micro (Wartewig Labor- und Dentaltechnik, Göttingen) **Geldokumentation:** BioDoc II (Biometra, Göttingen); Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator (UVP, Upland, USA) **Gelkammer:** Horizon 11·14, Agagel Mini (Biometra); Mini Protean III-System und Protean II xi (Bio-Rad) **Geltrockner:** Gel Dryer Modell 583 (Bio-Rad) **Hybridisierungsöfen:** OV3 (Biometra) **Inkubator:** MaxQ6000-8CE (Thermo); Minitron (Infors HT); BD-400 (Binder, Tuttlingen); CO₂-Inkubator Model 3164 (Forma Scientific/ Thermo); CO₂-Inkubator CB 150 (Binder); CO₂-Inkubator BB16 (Heraeus/ Thermo) **Isoelektrische Fokussierung:** IPTGphor (Pharmacia/ GE Healthcare) **Kühlschränke/ Gefrierschränke/ Ultra-Tiefkühlschränke:** diverse Modelle (Liebherr, Ochsenhausen); MDF-192 und MDF-492 (Sanyo, Bad Nenndorf); Forma 905 -86C ULT Freezer (Thermo) **Lyophilisator:** ALPHA 2-4 LSC (Christ, Osterode) + RC 6 (Vacuubrand, Wertheim) **Magnetrührer:** MR 2002, MR 3001 und MR 3002 (Heidolph, Schwabach); Monotherm (VarioMag/ Thermo); IKAMAG RET (IKA Jahnke&Kunkel, Staufen) **Massenspektrometer:** Q-Tof-2 (Micromass/ Waters, Manchester, UK) + 55-2222 Spritzenpumpe (Havard Apparatus, Holliston, USA) + Stickstoffgenerator UHP LC MS 12E und Luftentfeuchter CRDC24/E (Domnick Hunter, Birtley, UK) + Kompressor 2xOF1202-150B (Jun-Air, Ahrensburg) + Kühlthermostat KTC 606 (Applied Thermal Control, Whitwick, UK) **Mikroskope:** Diavert (Leitz/ Leica, Wetzlar); Wilovert 30 (Hund, Wetzlar); Axioskop 50 (Carl Zeiss, Jena); IX 50 (Olympus, Hamburg) **Mikrotiterplattenanalyse:** Sunrise (Tecan, Männedorf, Schweiz); Twinkle LB 970 (Berthold, Bad Wildbad); ELx50, EL800 und FLx800 (BioTek, Winooski, USA) **Netzteile:** Model 200/2,0, PowerPac 300 und PowerPac 3000xi (Bio-Rad) **pH-Meter:** inoLab pH 720 (WTW, Weilheim); Modell 60 (Jenco, Shanghai, China) **Photometer:** Spektrophotometer 150-20 (Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Mannheim); Biophotometer (Eppendorf); Nanodrop ND-1000 (Thermo) **Pipetten:** Pipetus (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt); Pipetboy acu (Integra Biosciences, Fernwald); Reference und Research (Eppendorf); pipetman (Gilson, Middleton, USA); Transferpette S, Dispensette und Dispensette III (Brand, Wertheim); Discovery comfort (HTL Lab Solutions, Warsaw, Polen) **Reinstwasseranlage:** Smart2Pure (TKA/ Thermo) **Rollenmischer:** Roller Mixer SRT1 (Stuart Scientific, Staffordshire, UK) **Schüttler:** Reax 2000

und Reax top (Heidolph, Schwabach); Vortex Genie 2, 3 und Roto-Shake Genie (Scientific Industries, Bohemia, USA); VF2, Vortex 3, LabDancer, VXR und KS 260 basic (IKA Jahnke&Kunkel); 3015 und 3005 (GFL); Hi/Low Profile Rocker (Stovall, Greensboro, USA); Rocking Platform (VWR); Unitwist-rt (Uniequip, Martensried) **Thermocycler:** Trio und T3 (Biometra); PTC-200 (MJ-Research/Bio-Rad); peqStar 96 Universal Gradient (peqlab) **Thermoschüttler:** Thermomixer 5436 und Thermomixer comfort (Eppendorf); MHR 11 (HLC BioTech/ DITABIS, Pforzheim) **Tischzentrifugen:** Mini Centrifuge C-1200 (National Labnet, Woodbridge, USA); Sprout und FlexiFuge (Biozym, Hessisch Oldendorf); Galaxy Mini (VWR, Hannover) **Ultraschallbad:** Sonorex Super RK 255H (Bandelin, Berlin) **Waagen:** 322-33 und 870-13 (Kern, Balingen-Frommern) Analysenwaage XS204 (Mettler Toledo, Gießen) **Vakuumkonzentrator:** Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg) + MZ 2C NT + AK Synchro + EK (Vacuubrand, Wertheim) **Vakuumpumpen:** 2522C-02 (Welch, Sheboygan, USA); Gel Pump GP100 (Savant/ Thermo) **Wasserbad:** 1002 (GFL, Burgwedel) **Wärmeschrank:** ULE 400 (Memmert, Schwabach) **Werkbänke/ Abzüge:** Cytosafe (Faster, Ferrara, Italien); Sterilarbeitsbank 8511 und Laborabzug (Köttermann Labortechnik, Uetze/ Hänigsen) **Zell- und Gewebeaufschluß:** Sonoplus GM 70 (Bandelin); La Moulinette (Krups, Offenbach a.M.); BeadBeater (Biospec, Bartlesville, USA); FastPrep®-24 (MP Biomedicals Europe, Illkirch, Frankreich); SpeedMill Plus (Analytik Jena, Jena), Ultra Turrax T25 (IKA Jahnke&Kunkel) **Zentrifugen:** 5810R, 5804R, 5417R, 5424 und 5415C (Eppendorf, Hamburg); Heraeus Labofuge 200, Heraeus Biofuge 17RS, Heraeus Megafuge 1,0R, Heraeus Fresco 21, Heraeus Multifuge X3R (Heraeus/ Thermo, Waltham, USA)

3.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei Sigma Genosys (Steinheim) mit dem Reinheitsgrad RP1 bestellt. Dabei erfolgt eine Auftrennung über eine Umkehrphasenkartusche, bei der die verkürzten Produkte abgetrennt werden.

Tab. 1: Trichohyalin-like1-Primer unterschiedlicher Fragmente. Unterstrichen ist die zur kodierenden Sequenz des TCHHL1 komplementäre Sequenz, dunkelgrau hinterlegt sind Erkennungs- und Schnittsequenz der Restriktionsenzyme, hellgrau sind die Stoppcodone unterlegt. In schwarz ist eine zum pPIC2a-Vector komplementäre Sequenz unterlegt, die notwendig ist um ein Protein mit einem nativen N-Terminus zu erhalten, die erste Temperatur entspricht der Schmelztemperatur der zum TCHHL1 komplementären Sequenz, die zweite Temperatur entspricht der Schmelztemperatur des gesamten Primers.

| | | | |
|---------------------------|---|------|--------|
| pSu3-thhl1-14-f1 (Bsal) | <u>AAGGTCTCAAGGT</u> <u>TACATTCCACAAATATGCCAGT</u> | 58°C | 73,7°C |
| pSu3-thhl1-248-r1 (BamHI) | <u>AAGGATCCTCATCTTATCTTGGAAAACACTTTGC</u> | 62°C | 72,8°C |
| pSu3-thhl1-369-f2 (Bsal) | <u>AAGGTCTCAAGGT</u> <u>ACAAAGGACCTGCCAGTCC</u> | 60°C | 76,5°C |
| pSu3-thhl1-784-r2 (BamHI) | <u>AAGGATCCTCATCTCTGCATCTGCTTTTCAAG</u> | 60°C | 74,6°C |
| pSu3-thhl1-90-f3 (Bsal) | <u>AAGGTCTCAAGGT</u> <u>TATCATTACTAAGTTCTGAACATAAG</u> | 64°C | 67,9°C |
| pESu3-thhl1-785-f4 (Bsal) | <u>AAGGTCTCAAGGT</u> <u>GACCAAGAGCCCTGTTCTGT</u> | 62°C | 77,7°C |
| pESu3-thhl1-904-r4 (XbaI) | <u>AATCTAGATCATTGCTTTGTGGTGCTTGCCCTCCC</u> | 72°C | 78,2°C |
| pPICZa-THHL1-F (XhoI) | <u>CTTCCTCGAG</u> <u>AAAAGA</u> <u>ATGCCTCAGCTCCTGAGA</u> | 56°C | 78,4°C |
| pPICZa-THHL1-R (NotI) | <u>GCGGATACAGCGGCCGCTCATTGCTTTGTGGTGCTTG</u> | 58°C | 88,2°C |

Tab. 2: Hornerin-Primer unterschiedlicher Fragmente und unterschiedlicher Mutationen. Unterstrichen ist die zur kodierenden Sequenz des HRNR komplementäre Sequenz, dunkelgrau hinterlegt sind Erkennungs- und Schnittsequenz der Restriktionsenzyme, hellgrau sind die Stopcodone unterlegt, fett sind die mutierten Nukleotide markiert, die erste Temperatur entspricht der Schmelztemperatur der zum HRNR komplementären Sequenz, die zweite Temperatur entspricht der Schmelztemperatur des gesamten Primers.

| | | | |
|--------------------------|--|------|--------|
| pSu-hr3-a-2576-f (Bsal) | <u>AAGGTCTCAAGGT</u> <u>GGCTTTGGTCACCACGAGT</u> | 60°C | 79,1°C |
| pSu-hr3-b-2591-f (Bsal) | <u>AAGGTCTCAAGGT</u> <u>AGTCAGCATGGGTCTGGCT</u> | 60°C | 77,1°C |
| pSu-hr3-c-2638-f (Bsal) | <u>AAGGTCTCAAGGT</u> <u>CAGTCTTCGGGCCACGGC</u> | 62°C | 82,3°C |
| pSu-hr3-d-2656-f (Bsal) | <u>AAGGTCTCAAGGT</u> <u>GGCCGACATGGGTCCGGT</u> | 62°C | 83,7°C |
| pSu-hr3-e-2658-f (Bsal) | <u>AAGGTCTCAAGGT</u> <u>CATGGGTCCGGTTTGGGG</u> | 60°C | 81,6°C |
| pSu-hr3-a-2707-r (BamHI) | <u>AAGGATCCTTAGTAAGCAGAGGAATGTCCTG</u> | 60°C | 70,8°C |
| pSu-hr3-b-2684-r (BamHI) | <u>AAGGATCCTTAATATGGGCCACGGCTGGAA</u> | 60°C | 77,4°C |
| pSu-hr3-d-2618-r (BamHI) | <u>AAGGATCCTTATCGTTACCCCTAGATGACTG</u> | 64°C | 73,5°C |
| pSu-hr3-e-2609-r (BamHI) | <u>AAGGATCCTTATCTAGAGCCGTGTTGTCCGT</u> | 62°C | 73,9°C |
| pSu-hr3-f-2644-r (BamHI) | <u>AAGGATCCTTAACGGGAGCCAGACCCATG</u> | 60°C | 77,4°C |
| hr3-2662G-f | <u>GTCCGGT</u> <u>GGC</u> <u>GGGCACTCCTCCAG</u> | 72°C | 82,1°C |
| hr3-2662G-r | <u>GTGCCC</u> <u>GCC</u> <u>ACCGGACCCATGTCG</u> | 72°C | 84,9°C |
| hr3-2629G-f | <u>CAC</u> <u>GG</u> <u>TGGTCAGCATGGGTCTGG</u> | 68°C | 76,7°C |
| hr3-2629G-r | <u>GCTGACCA</u> <u>CC</u> <u>GTGGGAAGACGAACC</u> | 74°C | 77,6°C |
| hr3-2603G-f | <u>CTGGC</u> <u>GG</u> <u>CGGACAACACGGCTC</u> | 68°C | 80,3°C |
| hr3-2603G-r | <u>TGTTGTCCG</u> <u>CC</u> <u>GCCAGAGGAGTG</u> | 68°C | 78,1°C |
| Su3-hr3-2684G-r (BamHI) | <u>AAAGGATCCTCA</u> <u>CC</u> <u>TGGGCCACGGCTGGAAGA</u> | 62°C | 83,8°C |
| pESu3-hrnr-3-f (FokI) | <u>AAGGGGATGAGCATGATTAGGT</u> <u>AAACTCCTACAAGGCGTCATC</u> | 62°C | 80,3°C |
| pESu3-hrnr-244-r (XhoI) | <u>AAGGCTCGAGTCAGTAACCAGAGGACTGCCC</u> | 58°C | 77,8°C |
| pESu3-hrnr-82-f (FokI) | <u>AAGGGGATGAGCATGATTAGGT</u> <u>GTTCAGGCTCGTAATAAAATC</u> | 58°C | 79,0°C |
| pESu3-hrnr-245-f (FokI) | <u>AAGGGGATGAGCATGATTAGGT</u> <u>AGTCAGCATGGATCTGGC</u> | 56°C | 81,8°C |
| pESu3-hrnr-478-r (XhoI) | <u>AAGGCTCGAGTCAGTAACCAGAGGAATGCTCT</u> | 56°C | 75,1°C |
| HRNR-2591-f-CyBr (SbfI) | <u>AAC</u> <u>CCTGCAGG</u> <u>GAGTAGATGAGTCAGCATGGGTCTGGCT</u> | 74°C | 83,6°C |

Tab. 3: Sequenzierprimer. Unterstrichen ist die zu der entsprechenden Vektorsequenz komplementäre Sequenz, die Temperatur entspricht der Schmelztemperatur des Primers.

| | | |
|---------------|------------------------------|--------|
| SUMO forward | <u>TCAATGAGGCAGATCAGATT</u> | 59,8°C |
| T7 reverse | <u>TAGTTATTGCTCAGCGGTGG</u> | 62,7°C |
| T7 term short | <u>CTAGTTATTGCTCAGCGG</u> | 56,1°C |
| AOX1-F | <u>GACTGGTTCCAATTGACAAGC</u> | 63,4°C |
| AOX1-R | <u>GCAAATGGCATTCTGACATCC</u> | 66,5°C |

3.4 Vektoren

(Vektorkarten Abb. 45 bis Abb. 50 im Anhang)

pET32a (Novagen/ Merck, Darmstadt)

pSUMO3 und pE-SUMO3 (LifeSensors, Malvern, USA)

pET-SUMO (Invitrogen/ life technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt)

pPICZ α A und pPink-HC (Invitrogen)

3.5 Antikörper

Primärantikörper:

Ziege α -Mensch rTCHHL1₁₄₋₂₄₈ polyklonaler Antikörper

Ziege α -Mensch rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ polyklonaler Antikörper

α -Trichohyalin, monoclonal Clone AE15, Maus α Mensch (Acris, Herford)

Ziege α -Mensch rHRNR₁₀₇₅₋₁₁₇₂ polyklonaler Antikörper

Ziege α -Mensch rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₆₂ polyklonaler Antikörper

Ziege α -Mensch rHRNR₂₇₂₇₋₂₈₅₀ polyklonaler Antikörper

Sekundärantikörper:

Maus α -Ziege IgG (H+L)-HRP 205-035-108 (Jackson ImmunoResearch/ Dianova, Hamburg)

Schaf α -Maus IgG (H+L)-HRP 515-035-062 (Jackson ImmunoResearch/ Dianova)

Ziege α -Kaninchen IgG (H+L)-HRP 111-035-144 (Jackson ImmunoResearch/ Dianova)

3.6 Enzyme

3.6.1 Polymerasen

*Pfu*Turbo Hotstart Polymerase (Stratagene)

Phusion HotStart II (Thermo/ Finnzymes)

Taq DNA Polymerase, native (invitrogen)

Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo/ Finnzymes)

Taq DNA Polymerase E (Genaxxon)

3.6.2 Restriktionsendonucleasen

Bsal, *Bam*HI, *Dpn*I, *Fok*I, *Hind*III, *Not*I, *Xba*I, *Xho*I (New England BioLabs)

*Bam*HI, *Eco*31I, *Fok*I, *Hind*III, *Not*I, *Sda*I, *Xba*I, *Xho*I FastDigest (Thermo/ Fermentas)

3.6.3 Ligasen

T4 DNA-Ligase (Invitrogen, Promega, Thermo/ Fermentas)

3.6.4 Proteasen

humanes α -Chymotrypsin (Sigma)

Collagenase NB 4G Proved Grade (Serva)

Elastase aus humanen Leukozyten (Sigma)

Enterokinase EKmax (Invitrogen)

Glu-C (Roche)

Kallikrein1, Kallikrein2, Kallikrein3, Kallikrein4, Kallikrein5 (stratum corneum tryptic enzyme - SCTE), Kallikrein7 (stratum corneum chemotryptic enzyme - SCCE) Kallikrein8, Kallikrein13 und Kallikrein14 (R&D)

Lys-C (Roche)

modifiziertes Trypsin (Roche)

Plasmin aus humanem Plasma (Sigma)

Proteinase K (Invitrogen)

SUMOProtease 1 und 2 (LifeSensors)

Thermolysin (R&D)

Thrombin aus humanem Serum (Sigma)

Trypsin (Roche)

3.6.5 Transglutaminasen

TGM1, 2 und 3 (Zedira)

3.6.6 Protein-Arginin Deiminase

humane PAD1 (cayman)

3.7 Mikroorganismen und Zellkulturen

3.7.1 *Escherichia coli*

DH5 α - (Invitrogen)- F⁻ ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ ⁻

TOP10 - (Invitrogen)- F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

XL1 Blue - (Stratagen) - *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI*^q Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

BL21(DE3) - (Novagen) - F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (DE3)

BL21(DE3)pLysS - (Novagen) - F⁻ *ompT hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^R)

Rosetta - (Novagen) - F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* pRARE (Cam^R)

Rosetta-gami 2(DE3)pLysS - (Novagen) - $\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA}$ *Pvull* *phoR* *araD139* *ahpC* *galE* *galk* *rpsL* (DE3) F' [*lac⁺* *lacI^q* *pro*] *gor522::Tn10* *trxB* pLysSRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R)
ATCC 11775, ATCC 11303, ATCC 35218

3.7.2 *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 10145, NCTC 11440, NCTC 11446

3.7.3 *Staphylococcus aureus*

ATCC 6538, ATCC 12600

3.7.4 *Bacillus megaterium*

ATCC 14581

3.7.5 *Candida albicans*

ATCC 24433

3.7.6 *Pichia pastoris*

X-33 – (Invitrogen) - Mut⁺

PichiaPink Stamm 4 - (Invitrogen) - *ade2⁻*, *prb1⁻*, *pep4⁻*

4 Methoden

4.1 Verwendete Software

| | |
|------------------------|--|
| analySIS getIT 5.1 | Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster |
| Chromas Lite 2.1 | Technelysium Ltd., South Brisbane, Australia |
| CloneManager 9 | Scientific & Educational Software, Morrisville, USA |
| EndNote X5 und X7 | Thomson Reuters, Philadelphia, USA |
| Fusion 15.17 | Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell |
| GeneDoc | Karl Nicholas, National Resource for Biomedical Supercomputing (NRBSC), Pittsburg, USA |
| GraphPad Prism 5.04 | GraphPad Software, La Jolla, USA |
| MassLynx V4.0 und V4.1 | Waters, Eschborn |
| MEGA 5.2 | Center for Evolutionary Medicine and Informatics, Tempe, USA |
| MS Office 2010 | Microsoft, Redmond, USA |
| Spectra Manager | Jasco, Gross-Umstadt |
| Unicorn 4.12 und 5.2 | GE Healthcare, Freiburg |

4.2 Bioinformatische Methoden

Für die *in silico* Untersuchung von Proteinen wurden die folgenden im Internet frei verfügbaren Programme verwendet.

Der „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) Algorithmus findet ähnliche Regionen einer Nukleotid- oder Proteinsequenz, indem es die eingegebene Sequenz mit den in verschiedenen Datenbanken hinterlegten Sequenzen vergleicht, und die Ergebnisse anhand einer statistischen Signifikanz der Ähnlichkeit auflistet. Anhand dieser Ähnlichkeiten können funktionelle oder evolutionäre Verhältnisse von Sequenzen zueinander bestimmt werden. Daneben können mit anderen Algorithmen (z. B. dem „Align“ Algorithmus) auch zwei oder mehrere Sequenzen miteinander verglichen werden. Dieses Programm wird durch das „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) und das „National Library of Medicine“ (NLM) unter der Adresse <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> zur Verfügung gestellt.

Die ProtParam Analysesoftware <http://web.expasy.org/protparam/> ermöglicht anhand der eingegebenen Proteinsequenz physikochemische Parameter zu berechnen. Die ProtScale Analysesoftware <http://web.expasy.org/protscale/> ermöglicht es anhand der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Aminosäuren in der untersuchten Proteinsequenz ein Profil von z. B. Hydrophobizität oder Sekundärstruktur zu generieren. Insgesamt stehen hierbei 57

in der Literatur beschriebene Ansätze mit verschiedenen Maßstäben zur Verfügung. Das Translate Programm <http://web.expasy.org/translate/> übersetzt die Nukleotidsequenz von DNA/ RNA in eine Proteinsequenz. Dabei berücksichtigt es alle drei Leserahmen und die beiden Leserichtungen. Das Programm T-Coffee <http://tcoffee.vital-it.ch/apps/tcoffee/index.html> ermöglicht multiple Sequenzvergleiche. Diese vier Programme werden auf dem www.expasy.org-Server durch das „Swiss Institute of Bioinformatics“ zur Verfügung gestellt (Gasteiger et al., 2005).

Das Protein Prospector Programmpaket erlaubt es in seinem Unterprogramm MS-Digest, anhand von Proteinsequenzen und vorgegebenen Proteasen oder durch chemischem Verdau die entstehenden Peptid-Fragmente zu erzeugen. Das Programm wurde von der „UCSF Mass Spectrometry Facility“ entwickelt und steht unter der Internetadresse <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm> zur Verfügung.

Neben diesen Programmen wurden auch verschiedene Datenbanken verwendet. Unter anderem wurden verschiedene Datenbanken, die auf dem NCBI-Server zur Verfügung gestellt werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/all/#databases>), genutzt (Wheeler et al., 2008). Daneben wurden aus der UniProt Datenbank sowohl aus der manuell überprüften und mit Erläuterungen versehenen Swiss-Prot Datenbank als auch aus der per Computer analysierten und noch nicht manuell überprüften TrEMBL Datenbank Informationen entnommen (<http://www.uniprot.org/>) (UniProt, 2012). Zusätzlich wurde die genomische Datenbank des „Ensembl“-Projekts verwendet (<http://www.ensembl.org/index.html>).

4.3 Molekularbiologische Methoden

Die für die Amplifikation notwendige cDNA wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Zhihong Wu aus unser Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Diese cDNA wurde durch reverse Transkription aus isolierter mRNA primärer humaner Keratinozyten gewonnen. Eine Beschreibung des Vorgehens ist in den Veröffentlichungen (Wu et al., 2009a; Wu et al., 2009b) zu finden.

4.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Methode der PCR können DNA-Abschnitte mit Hilfe von Polymerasen, die aus thermophilen Prokaryota stammen, spezifisch vervielfältigt werden. Dabei werden in einem sich wiederholenden Prozess die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt (Denaturierung).

An eine entsprechende Zielsequenz lagern sich spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, an („Annealing“). Diese kurzen Fragmente werden nun mit Hilfe der Polymerase verlängert („Elongation“). Dabei wird in jedem Zyklus die Menge der Ziel-DNA theoretisch verdoppelt. Die für das „Annealing“ notwendige Temperatur ist dabei abhängig von der Sequenz der Primer und der verwendeten Polymerase. PCR-Reaktionsansätze von 50 µL fanden Verwendung, wenn die DNA in nachfolgenden Experimenten weiter verwendet wurde. Polymerase-Ketten-Reaktionen, die dem Nachweis von DNA-Abschnitten dienten, wurden als 20 µL Reaktionen angesetzt. Die PCR-Protokolle wurden anhand der Herstellerangaben erstellt, die Temperaturen und Zeiten an die verwendeten Primer und die erwarteten Produkte angepasst, sowie die Mengen der Matrize anhand der verwendeten DNA (genomische DNA, cDNA, Plasmid oder PCR-Produkt) angepasst. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Matrize verwendet, eine Positiv-Kontrolle stand bei der PCR zur Kontrolle von Bakterienkolonien durch den Ligationsansatz zur Verfügung.

4.3.1.1 Standard-PCR mit niedriger Fehlerrate

Für die *Pfu*Turbo Hotstart Polymerase ist hier beispielhaft ein Protokoll aufgeführt.

| | Volumen | finale Konz. |
|---|-----------|---------------|
| 10x <i>Pfu</i> Cloned Puffer mit MgSO ₄ (Stratagene) | 5 µL | 1x |
| dNTPs mix, je 20 mM | 0,5 µL | 200 µM |
| forward-Primer 10 µM | 1 µL | 0,2 µM |
| reverse-Primer 10 µM | 1 µL | 0,2 µM |
| DNA-Template | 5 µL | <0,5 µg/50 µL |
| TKA-H ₂ O | 36,5 µL | |
| <i>Pfu</i> Turbo Hotstart Polymerase; 2,5 U/ µL (Stratagene) | 1 µL | 2,5 U |
| | Σ = 50 µL | |

| | | |
|------|--------|-----|
| 95°C | 1 min | |
| 95°C | 30 s | 33x |
| 55°C | 30 s | |
| 72°C | 45 s | |
| 72°C | 10 min | |
| 4°C | ∞ | |

| | | |
|------|-------|-----|
| 98°C | 1 min | |
| 95°C | 30 s | 10x |
| 53°C | 30 s | |
| 72°C | 1 min | |
| 95°C | 30 s | 23x |
| 64°C | 30 s | |
| 72°C | 1 min | |
| 72°C | 5 min | |
| 4°C | ∞ | |

Je nach verwendeten Primern und erwarteter Produktlänge wurden unterschiedliche PCR-Programme verwendet. Die Sequenzierprimer (Tab. 3) bestehen nur aus einer zum Vektor

komplementären Sequenz, so dass diese in der PCR vollständig binden. Werden diese Primer verwendet, wurde das PCR-Programm auf der linken Seite genutzt. Wurden Primer verwendet, die einen Sequenzanteil enthalten der nicht zu der Sequenz des TCHHL1 oder HRNR komplementär ist (Tab. 1 oder Tab. 2) wurde das PCR-Programm auf der rechten Seite verwendet. Hier wird in den ersten 10 Zyklen die PCR mit einer Temperatur durchgeführt, die der komplementären Sequenz des Primers zum TCHHL1 oder HRNR entspricht. In den nächsten 23 Zyklen binden die Primer dann mit ihrer vollständigen Sequenz an das neu generierte „Template“, so dass jetzt die Temperatur erhöht werden kann um die Spezifität der Reaktion zu verbessern.

Abschließend erfolgt eine Produktüberprüfung im 1,5 %igen Agarosegel wie unter Abschnitt 4.3.2 angegeben.

4.3.1.2 PCR zur Kontrolle von Bakterienkolonien

Mit Hilfe der Kolonie-PCR werden mehrere Kolonien aus der Transformation auf das Vorhandensein des entsprechenden Inserts überprüft. Hierfür wird ein insert- und ein vektorspezifischer Primer verwendet. Als Negativ-Kontrolle wird ein Ansatz ohne Zugabe von Bakterien und als Positiv-Kontrolle der Ligationsansatz verwendet. Die Bakterien der zu testenden Kolonie werden auf einer Masterplatte ausgestrichen und in dem PCR-Ansatz resuspendiert. In einem ersten Schritt werden die Bakterien erhitzt (94°C), so dass die DNA freigesetzt wird, die dann als Matrize für die sich anschließende PCR dient. Anschließend wird ein normales PCR-Programm durchlaufen.

Für die PCR zur Kontrolle von Bakterienkolonien ist hier beispielhaft ein Protokoll aufgeführt.

| | Volumen | finale Konz. |
|--|---------------------------|--------------|
| 10x Puffer E komplett (Genaxxon) | 2 µL | 1x |
| dNTPs mix, je 20 mM | 0,2 µL | 200 µM |
| forward-Primer 10 µM | 0,4 µL | 0,2 µM |
| rerverse-Primer 10 µM | 0,4 µL | 0,2 µM |
| <i>Taq</i> -Polymerase: 5 U/ µL (Genaxxon) | 0,2 µL | 1 U |
| TKA-H ₂ O | 16,8 µL | |
| | $\Sigma = 20 \mu\text{L}$ | |

Für die meisten Bakterien ist ein initialer Denaturierungsschritt von 94°C über drei Minuten ausreichend, andernfalls ist zu überprüfen, ob die verwendete *Taq*-Polymerase höhere Temperaturen und längere Zeiten ohne zu starken Aktivitätsverlust übersteht.

| | | |
|------|--------|-----|
| 94°C | 3 min | |
| 94°C | 30 s | 33x |
| 51°C | 30 s | |
| 72°C | 1 min | |
| 72°C | 10 min | |
| 4°C | ∞ | |

Abschließend erfolgt eine Produktüberprüfung im 1,5 %igen Agarosegel wie unter Abschnitt 4.3.2 angegeben.

4.3.1.3 PCR zum Austausch von Basentripletts

Zwei Methoden für den Austausch von Basentripletts fanden Verwendung. Als erstes wurde das „overlap-extension-PCR mutagenesis“-Protokoll von Vallejo angewendet (Vallejo et al., 1994b). Das Protokoll sieht zu Beginn zwei PCRs vor, die mit je einem Primerpaar für das 3'-Ende und das 5'-Ende des zu modifizierenden Fragmentes starten. In der folgenden „overlap extension“-PCR wird das Produkt mit dem Austausch des Basentripletts erzeugt (Abb. 9).

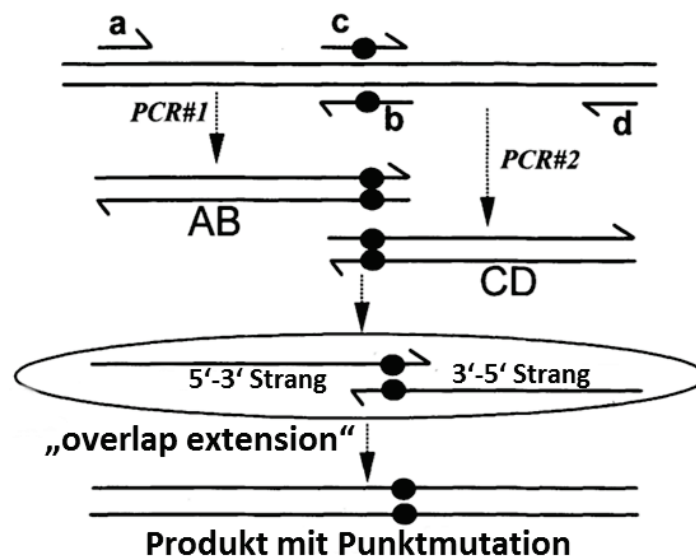


Abb. 9: Austausch von Basentripletts anhand des „overlap extension“-PCR Protokolls. Zwei Segmente einer DNA, im allgemeinen eines Gens, werden unabhängig voneinander per PCR vervielfältigt und in der nachfolgenden Reaktion miteinander verbunden. Die Mutationen werden durch die Mutationsprimer (b, c) eingebracht. Diese enthalten Fehlpaarungen (•) von Nukleotiden in der Mitte ihrer Sequenz. Da diese beiden Primer komplementär sind entstehen Produkte, die eine überlappende Sequenz haben und in der nachfolgenden PCR das Produkt mit dem ausgetauschten Basentriplett erzeugen, die Produktausbeute kann in der „overlap extension“-PCR durch die Zugabe der beiden äußeren Primern (a, d) noch erhöht werden (Vallejo et al., 1994a).

Es ist hier beispielhaft am Aminosäureaustausch Leucin gegen Glycin an Position 2662 und Tyrosin gegen Glycin an Position 2684 des Hornerins gezeigt. Für diese Reaktion sind die folgenden Primer notwendig.

a) Su3-hr3-b-2591-f b) hr3-2662G-r c) hr3-2662G-f d) Su3-hr3-2684G-r

Die Reaktionsvolumina entsprechen den unter Abschnitt 4.3.1.1 angegebenen. Das PCR-Programm wurde leicht abgewandelt und somit an die spezifischen Reaktionsbedingungen angepasst.

| | | |
|------|-------|-----|
| 98°C | 1 min | |
| 95°C | 30 s | 10x |
| 62°C | 30 s | |
| 72°C | 1 min | |
| 95°C | 30 s | 22x |
| 72°C | 1 min | |
| 72°C | 5 min | |
| 4°C | ∞ | |

Die Produktauftrennung erfolgte im 1,5 %igen Agarosegel. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (Abschnitt 4.3.2). Es wurden zwei DNA-Abschnitte erzeugt (unterstrichen sind die Primersequenzen, fett gedruckt sind die ausgetauschten Nukleotide und grau hinterlegt sind die Restriktionsschnittstellen):

Fragment a/b (235bp)

aaggtctcaa ggtagtcagc atgggtcttg ctcaggtcac tcctctggct acggacaaca
 cggctctaga tcaggacagt catctagggg tgaacgacac ggatctagct caggttcgtc
 ttcccactat ggtcagcatg ggtctggctc ccgtcagtct tcgggccacg gccgacaagg
 gtctggatct ggccagtccc ctagccgcgg ccgacatggg tccggtggcg ggcac

und Fragment c/d (88bp)

gtccggtggcg gggcactcct ccagccacgg ccaacatggg tctggctcag gtcgttcttc
cagccgtggc ccaggttgag gataccttt

Der folgende Schritt ist die eigentliche „overlap extension“-PCR. Dabei werden die im vorhergehenden Schritt hergestellten und aufgereinigten PCR-Produkte als Template und gleichzeitig als Primer zusammen mit den im ersten Schritt verwendeten Primern a) und d) in die PCR-Reaktion eingesetzt.

| | Volumen | finale Konz. |
|---|-----------|---------------|
| 10x <i>Pfu</i> Cloned Puffer mit MgSO ₄ (Stratagene) | 5 µL | 1x |
| dNTPs mix, je 20 mM | 0,5 µL | 200 µM |
| DNA-Template Fragment a/b | 2,5 µL | <0,5 µg/50 µL |
| DNA-Template Fragment c/d | 2,5 µL | <0,5 µg/50 µL |
| TKA-H ₂ O | 36,5 µL | |
| <i>Pfu</i> Turbo Hotstart Polymerase; 2,5 U/ µL (Stratagene) | 1 µL | 2,5 U |
| forward-Primer 10 µM | 1 µL | 0,2 µM |
| reverse-Primer 10 µM | 1 µL | 0,2 µM |
| | Σ = 50 µL | |

Das PCR-Programm wurde an die spezifischen Reaktionsbedingungen angepasst.

| | | |
|----------------|------------|-----|
| 98°C | 1 min | |
| 95°C | 30 s | 8x |
| 52°C | 2 min | |
| 72°C | 1 min | |
| 72°C | ∞ | |
| Primer zugeben | | |
| 95°C | 30 s | 23x |
| 72°C | 1 min 30 s | |
| 72°C | 5 min | |
| 4°C | ∞ | |

Die Produktauftrennung erfolgte im 1,5 %igen Agarosegel. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Das in dieser Reaktion erzeugte Fragment a/d hat eine Länge von 307bp (unterstrichen sind die Primersequenzen, doppelt unterstrichen ist der Bereich der von zwei Primersequenzen abgedeckt wird, fett gedruckt sind die ausgetauschten Nukleotide und grau hinterlegt sind die Restriktionsschnittstellen).

aaggtctcaa ggtagtcagc atgggtctgg ctcaggtcac tcctctggct acggacaaca
cggctctaga tcaggacagt catctagggg tgaacgacac ggatctagct caggttcgtc
ttcccactat ggtcagcatg ggtctggctc ccgtcagtct tcgggccacg gccgacaagg
gtctggatct ggccagtccc ctagccgcgg ccgacatggg tccggtggcg ggcactcctc
cagccacggc caacatgggt ctggctcagg tcgtttcttc agccgtggcc caggttgagg
atccttt

Das Fragment wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten (Abschnitt 4.3.4), in den entsprechend geschnittenen pSUMO3 Vector ligiert (Abschnitt 4.3.5) und in *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert (Abschnitt 4.4.3). Danach erfolgte eine Vervielfältigung und die Aufreinigung des Plasmids (Abschnitt 4.3.6).

Die zweite Methode wurde nach dem Protokoll des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Waldbronn) durchgeführt. Als „Template“ wurde „supercoiled“ dsDNA in Form eines Vektors verwendet, der die zu mutierende DNA-Sequenz enthält. In drei Schritten wird dabei die Mutation direkt in das Plasmid eingefügt (Abb. 10).

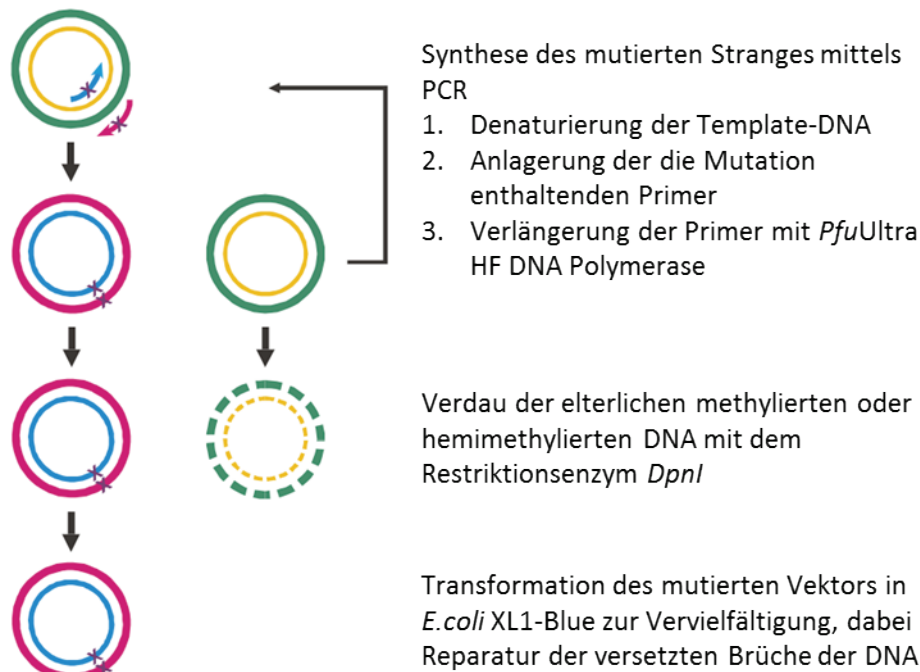


Abb. 10: Übersicht über die „QuikChange II site-directed mutagenesis“ Methode. Der grün und gelb Kreis entspricht den parentalen Strängen des Vektors ohne Mutation. Der blaue und der rote Pfeil symbolisiert die beiden Primer, das Kreuz entspricht den Mutationen. Der rote und der blaue Kreis stehen für die neuen Stränge des Vektors mit der eingeführten Mutation (Kreuz). Der gestrichelte grüne und gelbe Kreis entspricht den mit dem Restriktionsenzym *DpnI* hydrolysierten parentalen Strängen des Vektors.

Dafür sind zwei komplementäre Primer mit den entsprechenden Mutationen erforderlich. In einer PCR werden die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt die Primer angelagert und verlängert. Die Verlängerung der Primer erzeugt mutierte Plasmide, die nicht geschlossene versetzte Brüche enthalten und nicht methyliert sind. Die Produkte der PCR werden mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, das als Endonuklease die am Guanin methylierte Sequenz 5'-Gm⁶ATC-3' erkennt und schneidet. Da nur die ursprünglichen Plasmide oder die Hybride aus ursprünglicher und neu synthetisierter mutierter DNA methyliertes Guanin enthalten, werden auch nur diese Plasmide geschnitten. Die so angereicherten Plasmide, die die entsprechende Mutation tragen, werden in *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Die PCR, der *DpnI*-Verdau und die Transformation wurden nach den in der Anleitung des Herstellers angegebenen Vorgaben durchgeführt.

4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente aus den PCRs (Abschnitt 4.3.1) erfolgte in der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Bei DNA-Fragmenten zwischen 1000 und 10000 bp wie z. B. Plasmiden wurden 1,0 %ige Gele und bei DNA-Fragmenten zwischen 100 und 2500 bp wurden 1,5 %ige Agarosegele gegossen. Dazu wurde die entsprechende Menge „low melting“ Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) in der Mikrowelle aufgekocht, bis diese sich vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlung wurde in die noch immer dünnflüssige Lösung 1 µg/mL Ethidiumbromid gegeben, gut durchmischt und in einen horizontalen Gelträger mit eingesetztem Kamm gefüllt. Nach dem Gelieren wurde das Gel in die Laufkammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit einem sechsfach konzentrierten Probenpuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 60 mM EDTA, 60 % Glycerol, 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol und 0,15 % OrangeG) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Komigrationsstandard fanden 100 bp TriDye DNA Ladder von New England Biolabs, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder von Thermo/ Fermentas oder Smartladder von Eurogentec Verwendung. Die Elektrophorese wurde mit 80 V gestartet und nach 5 min auf 120 V erhöht. Eine Variation der Dauer der Elektrophorese fand in Abhängigkeit von der DNA-Fragmentlänge statt. Abschließend wurde die Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids mit der DNA unter UV-Licht detektiert.

4.3.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die für weitere Schritte notwendigen PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel (Abschnitt 4.3.2) ausgeschnitten und mit dem QIAEX Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen), NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Machery-Nagel) oder dem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo/ Fermentas) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Bei Fragmenten kleiner als 125 bp war die Aufreinigung aus dem Gel mit den angegebenen Kits nicht erfolgreich, so dass die PCR-Produkte ohne vorhergehende Agarose-Gelelektrophorese direkt mit dem NucleoTrap Kit (Machery-Nagel) nach Angaben des Herstellers aus dem entsprechenden Ansatz aufgereinigt wurden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Auftragen eines Zehntels des Eluats und dem quantitativen Vergleich mit der Intensität der verschiedenen Banden eines Komigrationsstandards oder durch photometrisch Bestimmung am NanoDrop.

4.3.4 Restriktionshydrolyse

Bei der Restriktionshydrolyse wird durch sequenzspezifische, enzymatische und asymmetrische Hydrolyse des DNA-Doppelstranges ein Überhang generiert („sticky ends“ - klebrige Enden), der bei der Wahl von zwei verschiedenen Schnittsequenzen die gerichtete Einbindung einer Sequenz in ein Plasmid ermöglicht. Hierzu müssen in dem Plasmid die komplementären Sequenzüberhänge generiert werden. Alternativ gibt es auch eine Restriktionshydrolyse die sequenzspezifisch, enzymatisch eine symmetrische Hydrolyse des DNA-Doppelstranges durchführt und dabei keinen Überhang generiert („blunt ends“ – glatte Enden). Bei den glatten Enden tritt das Problem auf, dass die DNA in zwei verschiedenen Richtungen ligiert werden kann. Deshalb ist hier eine zusätzliche Analyse der Ligationsprodukte notwendig. Die Restriktionshydrolyse erfolgte entweder mit den Enzymen von New England Biolabs oder mit den FastDigest Enzymen von Fermentas/ Thermo. Während die Restriktionshydrolyse von PCR-Produkten mit den FastDigest Enzymen in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers bei 37°C für 10 min durchgeführt wurde, erfolgte die Restriktionshydrolyse von Plasmiden mit FastDigest Enzymen bei 37°C für 1 h. Wurde der Ansatz nach der Inkubation für mehr als eine Stunde gelagert, erfolgte eine Inaktivierung der Restriktionsenzyme bei 65°C für 10 min. Bei der Verwendung der Restriktionsenzyme von New England Biolabs wurde bei einem Doppelverdau immer der Puffer gewählt, in dem die beiden verwendeten Enzyme die höchste Aktivität aufwiesen. Entsprechend der Angaben des Herstellers wurde bei 37°C oder 50°C für 3 h inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte durch ein 20-minütiges Erhitzen auf 65°C. Der Restriktionsverdauansatz wurde anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.

4.3.5 Ligation

Bei der Ligation werden enzymatisch zwei DNA-Moleküle miteinander verknüpft. Dabei kommt es zur Basenpaarung der klebrigen Enden und Bildung einer Bindung zwischen der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe. Die Ligation erfolgte mit T4 DNA-Ligase von Invitrogen, Promega oder Fermentas nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers. Das molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor soll laut Herstellerangaben zwischen 1:1 und 8:1 betragen. In fast allen Experimenten war ein molares Verhältnis von 3:1 erfolgreich. Die Stoffmenge der beteiligten Ligationsspartner wurde für jeden Ligationspartner so berechnet, dass diese mindestens 15 fmol im Ligationsansatz betrug (15 fmol eines 1 kbp langen DNA-Fragments entsprechen 10 ng) um so eine optimale Ligation zu erreichen (Housby et al., 2000).

Der Ligationsansatz wurde für 8 h bei 16°C inkubiert und dann transformiert (Abschnitt 4.4.3) oder für eine längere Lagerung bei -20°C eingefroren.

4.3.6 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolation erfolgte mit Kits verschiedener Hersteller nach deren Angaben. Verwendet wurden für die Isolation kleiner Plasmidmengen die folgenden Kits: NucleoSpin® Plasmid von Macherey-Nagel, QIAprep® Miniprep von Qiagen, PureYield™ Plasmid Miniprep von Promega und GeneJET™ Plasmid Miniprep von Fermentas. Für eine Übernachtskultur wurden in einem Kulturröhrchen 5 mL LB-Medium (10 g papainisch verdautes Sojapepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl mit demineralisiertes Wasser auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert, pH 7,0) versetzt mit den notwendigen Antibiotika mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm angeimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Von den Expressionsvektoren wurden für den Restriktionsverdau größere Plasmidmengen benötigt, die mit dem Genopure Plasmid Midi Kit von Roche aufgereinigt wurden. Dazu wurde in einem 100 mL Erlenmeyerkolben 25 mL LB-Medium versetzt mit den notwendigen Antibiotika mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm angeimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Bei den Kits kommen zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung. Die erste Methode beruht auf einer alkalischen Lyse, bei der die Plasmid-DNA an eine Silika-Membran gebunden wird, mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen wird und schließlich mit einem leicht alkalischen Puffer eluiert wird. Die zweite Methode beruht ebenfalls auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen, der Bindung der Plasmid-DNA an einen Anionentauscher bei niedrigem pH und geringer Salzkonzentration, dem Waschen der gebundenen Plasmid-DNA mit einer leicht salzhaltigen Waschlösung und einer Elution mit einer Lösung mit hoher Salzkonzentration gefolgt von einer Konzentrierung und Entsalzung durch Präzipitation der Plasmid-DNA mit Alkohol.

4.3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierungen erfolgten durch externe Dienstleister, entweder bei Sequence Laboratories Göttingen GmbH (SeqLab) oder im Institut für klinische Molekularbiologie (IKMB) der CAU. In beiden Fällen wurde mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) in einem Fluoreszenz-Kapillar-Sequenzierer sequenziert.

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀)

Die Messung der optischen Dichte ist eine Möglichkeit, anhand einer Standardkurve die Anzahl der Bakterienzellen in einer Suspension zu bestimmen. Diese OD₆₀₀-Werte gelten nur für die getesteten Bakterien an dem verwendeten Photometer. Vorab wurde zu diesem Zweck eine Wachstumskurve von dem entsprechenden Bakterienstamm aufgenommen, um den linearen Bereich und den Wendepunkt in der exponentiellen Phase der Wachstumskurve zu bestimmen. Die lineare Abhängigkeit zwischen Zelldichte und der OD₆₀₀ ist nur in einem Bereich von ca. 0,05 bis 0,5 gegeben, d. h. für hohe Bakteriendichten muss immer eine Verdünnung in dem entsprechenden Medium hergestellt werden. Bei allen Messungen erfolgte diese gegen einen Leerwert des Mediums. Für die Standardkurve wurde eine Kultur der zu untersuchenden Bakterien in Medium bis zum mittleren logarithmischen Bereich, also dem Wendepunkt der Wachstumskurve, kultiviert. Dazu wurden die Bakterienzellen zentrifugiert und eine Konzentrationsreihe mit folgenden OD₆₀₀ Werten in dem entsprechenden Medium erstellt: 1,0; 0,75; 0,5; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,02 und 0,01. Von diesen Proben wurden dezimale Verdünnungsreihen auf LB- Agarplatten (10 g papainisch verdautes Sojapepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Select Agar, mit demineralisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert, pH 7,0) ausplattiert und die Kolonien später ausgezählt. Damit ließ sich durch die Bestimmung des OD₆₀₀-Wertes auf die Lebendzahl der Bakterien in der Suspension zurückschließen. Zu bedenken ist bei dieser Form der Bestimmung der Bakterienzahl, dass ausschließlich lebende Zellen gezählt werden, tote Zellen, die sich aber auch in der Suspension befinden, tragen ebenfalls zu einer Streuung des Lichts bei, können aber keine Kolonie bilden und werden deshalb nicht mitgezählt.

4.4.2 Herstellung chemisch-kompetenter und elektrokompenter Bakterien

Als Kompetenz wird in der Bakteriengenetik die Fähigkeit von Bakterienzellen bezeichnet freie auch artfremde DNA aufzunehmen. Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. Bei einigen Bakterienarten kommt eine natürliche, im Genom kodierte Kompetenz vor. *E. coli* ist nicht natürlich kompetent, so dass durch Behandlung der Zellen eine künstliche Kompetenz erzeugt werden muss. Dafür stehen zwei Methoden zur Verfügung.

4.4.2.1 CaCl₂-kompetente Zellen

Chemisch-kompetente Zellen wurden von den Stämmen *E. coli* TOP10, BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS hergestellt. Dazu wurden die Bakterien auf einer TSB-Agarplatte (30 g CASO Broth, 15 g Select Agar, auf 1 L mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert, pH 7,3 ± 0,2), die mit den für den jeweiligen Stamm notwendigen Antibiotika versetzt worden war, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in einem Kulturröhrchen mit 5 mL TSB-Medium (30 g CASO Broth auf 1 L mit demineralisiertes Wasser aufgefüllt und autoklaviert, pH 7,3 ± 0,2), und entsprechendem Antibiotika, angeimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht kultiviert. In einem 250 mL-Erlenmeyerkolben wurden 40 mL mit entsprechendem Antibiotikum versetztes TSB-Medium mit 500 µL der Starterkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 kultiviert. Die nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis mit entsprechend vorgekühlten Lösungen und Gefäßen durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde in ein 50 mL-Schraubdeckelgefäß gefüllt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4000 x g wurde das Bakterienpellet in 20 mL TBS (100 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,0) resuspendiert. Die Suspension wurde bei 4000 x g für 10 min zentrifugiert, das Bakterienpellet in 20 mL CaCl₂-Lösung (100 mM CaCl₂, 5 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,0) resuspendiert, für 20 min auf Eis inkubiert und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Bakterienpellet in 2 mL CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µL 86 %iges Glycerol zugegeben, der Ansatz gut durchmischt und die Bakteriensuspension zu 50 µL aliquotiert. Nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Aliquots bei -80°C gelagert.

4.4.2.2 Elektrokompetente Zellen

Elektrokompetente Zellen wurden von den *E. coli*-Stämmen XL1 Blue, BL21(DE3)pLysS, Rosetta und Rosetta-gami 2 (DE3)pLysS hergestellt. Dafür wurden die Bakterien auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde mit 20 mL LB-Medium mit Antibiotika angeimpft in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Von dieser Starterkultur wurden 2 mL in 200 mL LB-Medium und entsprechenden Antibiotika überimpft und in einem 1 L-Erlenmeyerkolben bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Im Anschluss erfolgten alle weiteren Schritte bei 4°C oder auf Eis mit entsprechend vorgekühlten Lösungen und Gefäßen. Die Bakteriensuspension wurde in vier 50 mL-Schraubdeckelgefäße gefüllt und

bei 4000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Bakterienpellets in 5 mL TKA-Wasser/ demineralisiertes Wasser 1:1 vorsichtig resuspendiert. Die Bakteriensuspension aus jeweils zwei 50 mL-Schraubdeckelgefäßen wurden vereinigt und mit 50 mL TKA-Wasser/ demineralisiertes Wasser 1:1 zweimal gewaschen. Die beiden Pellets wurden jeweils in 10 mL 10 %iger Glycerol-Lösung resuspendiert und nach 20-minütiger Zentrifugation bei 3000 x g und 0°C der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden jeweils in 1 mL 10 %iger Glycerol-Lösung resuspendiert und in 50 µL Aliquots auf Trockeneis oder alternativ in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die elektrokompetenten Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

4.4.3 Transformation

Für die Transformation chemisch kompetenter Zellen wurde ein Aliquot CaCl_2 -kompetenter Zellen auf Eis für 3 min aufgetaut. Es wurden 2,5 µL des Ligationsansatzes (Abschnitt 4.3.5) oder eines gereinigten Plasmids zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30 s wurde der Ansatz für 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 600 µL auf 37°C vorgewärmten SOC-Medium (2 g Sojapepton, 0,5 g Hefeextrakt, 1 mL 1 M NaCl, 0,25 mL 1 M KCl mit NaOH den pH auf 7,0 eingestellt, auf 98 mL mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert, 1 mL steriles 1M MgCl_2 und 1 mL 2 M Glukose zugegeben) zu pipettiert. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

Für die Elektroporation (elektrische Transformation) wurde ein Aliquot elektrokompetenter Zellen auf Eis für 5 min aufgetaut und dann 1,5 µL des Ligationsansatzes oder eines gereinigten Plasmids zugegeben und für 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand im Elektroporator dem elektrischen Feld ausgesetzt. Dabei wurde das Programm Ec1 verwendet bei dem ein Puls mit einer Feldstärke von 1,8 V/mm und einer typischen Dauer von um die 5 ms generiert wird. Danach wurde sofort 1 mL des auf 37°C vorgewärmten SOC-Mediums zugegeben und gut durchmischt. Der Ansatz wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert.

4.4.4 Selektion

Zur Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien wurden 50 und 250 µL des Ansatzes auf frischen und vorgewärmten LB-Antibiotika-Selektions-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf eine

neue LB-Antibiotika-Selektions-Agarplatte überimpft und erneut bei 37°C über Nacht inkubiert und dann im Kühlschrank bis zur Bestätigung der richtigen Sequenz bzw. der richtigen molekularen Masse des Fusionsproteins gelagert. Parallel wurde eine Kolonie-PCR (Abschnitt 4.3.1.2) durchgeführt, die das Vorhandensein des Vektors und des Inserts durch die Verwendung eines Vektor- und eines Insertspezifischen Primers überprüft.

4.4.5 Lagerung

Für die Langzeitlagerung wurden die Bakterien in 3 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika von der Masterplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 5 mL frisches LB-Antibiotika-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,01 eingestellt und die Bakterien bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 bei 5000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 700 µL LB-Medium resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 300 µL 86 %iges Glycerol gegeben, die Suspension gut durchmischt und in Kryoröhrchen überführt. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung bei -80°C.

4.4.6 Rekombinante Protein-Expression in E. coli

Die Protein-Expression erfolgte mittels spezieller Expressionsvektoren. Das Prinzip der Expressionsvektoren beruht auf einer durch IPTG induzierbaren Protein-Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus dem Zielprotein und einem sogenannten Fusions-„Tag“. Verwendet wurden die pSUMO3- bzw. pE-SUMO3-Vektoren von LifeSensors. Der Vorteil dieser Expressionsvektoren liegt in dem Fusionsteil. Dieser besteht aus einem Amino-terminalen Hexahistidin, über den die affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgt und einem 93 Aminosäuren großen SUMO (Small Ubiquitin-like MODifier)-Protein, das für die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins notwendig ist. LifeSensors bietet zwei verschiedene Vektoren an, den pE-SUMO Vektor (bzw. dessen Vorgänger pSUMO), der auf dem Ubiquitin-like protein SMT3 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* basiert. Der pE-SUMO3 Vektor (bzw. dessen Vorgänger pSUMO3) basiert dagegen auf dem humanen Small ubiquitin-related modifier 3 SUMO3. Der SUMO-„Tag“ bildet in beiden Fällen eine stabile globuläre dreidimensionale Struktur aus, die die Expression und Löslichkeit des Zielproteins erhöht und die unspezifische Proteolyse verringert. Die dreidimensionale Struktur des pE-SUMO-„Tags“ wird von der SUMO-Protease1, die des pE-SUMO3-„Tags“ von der SUMO-Protease2 erkannt. Diese schneiden hochspezifisch und aminosäuregenau hinter den beiden Carboxy-terminalen

Glycinen des „Tag“ und ermöglicht so die Generierung eines hochreinen Proteins, ohne dass zusätzliche Aminosäuren am Zielprotein verbleiben. Die Vektoren besitzen sogenannte „multiple cloning sites“ (MCS). Diese beinhalten mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die nur einmal innerhalb der Vektorsequenz vorkommen. Dabei werden zwei Restriktionsenzyme aus der MCS ausgesucht, die nicht in der Sequenz des Zielgens vorkommen. Die Primer für die Amplifikation wurden entsprechend dieser Auswahl erstellt. Der Aufbau der Vektoren ist in den Vektorkarten im Anhang (Abb. 47 und Abb. 48) dargestellt.

Da die proteolytische Aktivität der SUMO-Protease2 sehr starken Schwankungen unterlag wurden Überlegungen hinsichtlich einer alternativen Expression angestellt. Hierfür wurde die chemische Spaltung nach einem Methionin durch Bromcyan ausgewählt, da innerhalb der jeweiligen Zielproteine kein Methionin vorhanden ist. Somit ist sichergestellt, dass es zu keiner unbeabsichtigten Spaltung innerhalb des Zielproteins kommt. Für dieses Vorhaben wurde ebenfalls der pE-SUMO3 Vektor verwendet. Hierbei wurde jedoch der SUMO-„Tag“ depletiert, da befürchtet wurde, dass aufgrund von drei Methioninen innerhalb der Sequenz des „Tag“ Fragmente entstehen, die nach der chemischen Spaltung gleichzeitig mit dem Zielprotein in der HPLC eluieren und somit die Aufreinigung erschweren. Der Nachteil dieses Vorgehens ist der Verzicht auf die bereits oben genannten Vorteile, die mit der Verwendung des „Tag“ verbunden sind. Der neue verkürzte „Tag“ besteht nur aus der folgenden Sequenz GHHHHHGSLSQEM, auf die die Sequenz des Zielproteins folgt. Das Hexahistidin ist für die Aufreinigung erforderlich, die weiteren Aminosäuren ergeben sich aus der Restriktionsschnittstelle im pESUMO3-Vektor bieten aber den Vorteil, dass somit ein kleiner „Linker“ zwischen dem Hexahistidin und dem Methionin vor dem Zielprotein vorhanden ist. Die Spaltung mit Bromcyan erfolgt Carboxy-terminal vom Methionin. Hierbei wurde am 5'-Ende des +-Stranges eine SdaI bzw. SbfI Restriktionsschnittstelle außerhalb der MCS und am 3'-Ende die auch schon vorher genutzte BamHI Restriktionsschnittstelle der MCS verwendet.

Für die Expression wurden in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben 20 mL LB-Medium und entsprechenden Antibiotika mit dem bei -80°C gelagerten *E. coli* angeimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag die OD₆₀₀ bestimmt und eine 250 mL-Expressionskultur in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika in einem 1 L-Erlenmeyerkolben auf eine OD₆₀₀ von 0,01 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm

bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 kultiviert. Die Protein-Expression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kulturen für 3h bei 37°C und 200 rpm inkubiert.

Alternativ erfolgte die Expression im Fermenter. Hier wurden 4 L LB-Medium und entsprechende Antibiotika mit der Bakterien-Vorkultur angeimpft und bei 37°C und konstantem pH von 7,4 sowie einem möglichst hohen Sauerstoffpartialdruck bis zu einer OD₆₀₀ von 3,8 kultiviert. Die Protein-Expression wurde mit 1mM IPTG induziert und bei konstantem pH und einem möglichst hohen Sauerstoffpartialdruck für drei Stunden bei 37°C durchgeführt. Eine Messung der OD₆₀₀ zum Zeitpunkt der Ernte zeigte eine Vervierfachung des OD₆₀₀-Wertes nach Induktion. Für die Ernte wurde die Expressionskultur pelletiert, das Bakterienpellet in 1/50 des Ausgangsvolumens an NPI-20 Puffer (20 mM Natriumphosphatpuffer, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,4) resuspendiert und bei -80°C gelagert. Die Bakteriensuspension aus dem Fermenter wurde vor der Lyse noch 1:5 mit NPI-20 verdünnt, so dass 1 ml ca. 50 ml Expressionskultur mit einer OD₆₀₀ von 3,5 entspricht.

Die Lyse der Bakterien erfolgte nach dem Auftauen im Wasserbad bei 37°C durch Ultraschall. Dazu wurden 5 mL Bakterienzellsuspension im 50 mL-Reaktionsgefäß auf Eis mit 10 Zyklen á 12 s Ultraschall (50 % Power; 60 % Puls pro Zyklus) und 30 s Pause aufgeschlossen. Die so behandelten Suspensionen wurden für 60 min bei 15500 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand steril filtriert (0,45 µm Porendurchmesser). Die kurzfristige Lagerung erfolgte auf Eis. Andernfalls wurde die Lösung bei -20°C gelagert.

4.4.7 Rekombinante Expression in der Hefe *Pichia pastoris*

Die Expression des Trichohyalin-like1 wurde mit Hilfe der rekombinanten Expression in der Hefe *Pichia pastoris* durchgeführt. Dabei wurden die beiden Expressionssysteme „EasySelect Pichia“ und „PichiaPink“ von Invitrogen verwendet. Die Hefe *Pichia pastoris* vereint als Expressionssystem dabei die Vorteile eines eukaryotischen Expressionssystems in Form einer Prozessierung, Faltung und postrationalen Modifikation der Proteine mit der einfachen molekularbiologischen Veränderung des Hefegenoms, vergleichbar mit der bei *E. coli*. Zusätzlich ist die Proteinausbeute im Vergleich mit anderen eukaryotischen Expressionssystemen um ein Vielfaches höher. Dieses lässt sich über eine Expression im Fermenter über eine Steigerung der Zelldichte noch weiter erhöhen. Bei *Pichia pastoris* handelt es sich um eine methylotrophische Hefe, also um eine Hefe die in der Lage ist, Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Das erste dafür notwendige Enzym, die

Alkoholoxidase, das die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd katalysiert, hat eine niedrige Affinität zu dem notwendigen Sauerstoff. Dieses Defizit kompensiert *Pichia pastoris* durch die Expression sehr großer Mengen dieses Enzyms. Der Promotor, unter dessen Kontrolle die Expression der Alkoholoxidase steht, wird auch für die heterologe, also die Expression artfremder Proteine in *Pichia pastoris* verwendet.

4.4.8 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

Die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von verschiedenen Trichohyalin-like1- und Hornerin-Proteinfragmenten erfolgte mit Hilfe zweier unterschiedlicher Testsysteme: dem Radialdiffusionstest und dem Mikroverdünnungstest in Anlehnung an Steinberg und Lehrer (Steinberg und Lehrer, 1997). Beide Tests wurden im Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchgeführt.

4.4.8.1 Radial Diffusion Assay (RDA) - Radialdiffusionstest

Beim RDA wurden die jeweiligen Mikroorganismen aus einer Übernachtskultur in 8 mL TSB-Medium für 2-3,5 h bei 37°C und 120 rpm kultiviert. Je nach verwendetem Bakterienstamm wurden unterschiedliche Volumina überimpft und die Kulturen verschieden kultiviert; eine Übersicht ist in Tab. 4 gezeigt.

Tab. 4: Übersicht über die Volumina und Kulturbedingungen im Radialdiffusionstest.

| Gattung | überimpftes Volumen aus Übernachtskultur | Inkubation der Kultur bei 37°C | Volumen in 10 mL „Underlay“ |
|-----------------------|--|--------------------------------|-----------------------------|
| <i>Escherichia</i> | 50 µL | Standkultur | 50 µL |
| <i>Pseudomonas</i> | 50 µL | Schüttelkultur | 50 µL |
| <i>Staphylococcus</i> | 100 µL | Standkultur | 100 µL |
| <i>Candida</i> | 200 µL | Schüttelkultur | 200 µL |

Die „Underlay“-Agarose (1 % (w/v) Agarose (Elektrophorese-Grad, Invitrogen), 0,02 % (v/v) Tween20, 1 % (v/v) TSB-Medium, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2-7,4) wurde verflüssigt und auf 46°C gehalten. Jeweils 10 mL „Underlay“-Agarose wurden anschließend mit verschiedenen Volumina der Bakterien (Tab. 4) versetzt und gründlich gemischt. Die Suspension wurde in Petrischalen gegossen und ausgehärtet. Mit Hilfe einer Hautstanze mit 3 mm Durchmesser wurden Löcher in die „Underlay“-Agarose gestanzt. Die auf antimikrobielle Aktivität zu testenden Proben wurden in entsprechender Konzentration in 0,01 % (v/v) Essigsäure gelöst. Von diesen Substanzen wurden je 5 µL in die gestanzten Löcher

gegeben. Als Positiv-Kontrolle wurde bei pH 7,3 humanes Lysozym (100 ng/ μ L in 0,01 % Essigsäure) und bei pH 5,5 Chlorhexidin (31 ng/ μ L in 0,05 % Essigsäure), als Negativ-Kontrolle 0,01 % Essigsäure verwendet. Es folgte eine Inkubation für 16 h (über Nacht) bei 37°C. Es wurde „Overlay“-Agarose (1 % (w/v) Agarose, 3,4 % (w/v) Caseinpepton, 0,6 % (w/v) Sojamehlpepton, 0,5 % (w/v) D+-Glukose-Monohydrat, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,2-7,4) verflüssigt und auf 46°C gehalten. Die „Underlay“-Agarose wurde nach Inkubation mit der „Overlay“-Agarose überschichtet. Nach Aushärtung der Platten wurden diese für 3 h bei 37°C inkubiert, im Anschluss wurden die Hemmhöfe vermessen.

4.4.8.2 Micro Dilutions Assay (MDA) - Mikroverdünnungstest

Die Testung antimikrobieller Aktivität im flüssigen System erfolgte mithilfe eines MDA. Die Übernachtskultur und die Vorkultur wurden wie schon zuvor beschrieben (Tab. 4) angesetzt. Zur Wachstumskontrolle wurde von den Kulturen die Transmission bei 540 nm bestimmt. Es folgten zwei Waschschriffe in dem Puffer, der auch im nachfolgenden Test verwendet wurde. Als Puffer wurden verschiedene Natriumphosphatpuffer verwendet: 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2-7,4/ 1 % (w/v) TSB; 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,5/ 1 % (w/v) TSB; 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2-7,4/ 0,25 % (w/v) Glukose (13,88 mM); 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,5/ 0,25 % (w/v) Glukose (13,88 mM), auch mit unterschiedlichen Konzentrationen von verschiedenen Salzen. Die Kultur wurde in 10 mL des jeweiligen Puffers resuspendiert und die Transmission bei 540 nm erneut kontrolliert. Anschließend wurden die Bakterien auf eine Konzentration von 10^4 - 10^5 Keimen pro mL eingestellt. Zur Keimzahlkontrolle wurden jeweils 100 μ L in 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnungen in Doppelwerten auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Von der Bakteriensuspension wurden 100 μ L mit 10 μ L der zu testenden Substanz in entsprechenden Konzentrationen gemischt und 2 bzw. 3 h bei 37°C inkubiert. Als Negativ-Kontrollen dienten 10 μ L 0,01 % Essigsäure. Nach Ende der Inkubation wurden von jedem Ansatz 1:10- und 1:100-Verdünnungen hergestellt und davon je 100 μ L in Doppelwerten auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Nach 16 h Inkubation bei 37°C wurden die kolonienbildenden Einheiten ausgezählt. In Bezug auf die Negativ-Kontrolle wurde die LD₉₀ berechnet. Als Lethale Dosis 90 % (LD₉₀) wird die Konzentration der zu testenden Substanz bezeichnet, bei der 90 % oder mehr Bakterien abgetötet werden. Zusätzlich wurde auch die minimale bakterizide Konzentration (MBK) bestimmt, bei der 99,99 % der Bakterien abgetötet werden.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Proteinextraktion aus Vollhaut, Epidermis, Kallus und Haarwurzeln

Zum Nachweis von natürlichem Trichohyalin-like1 wurden Proteine sowohl aus Vollhaut, Epidermis, und Kallus isoliert. Dazu wurde die Vollhaut vom subkutanen Fettgewebe befreit und in kleine Stücke von 5 mm Kantenlänge geschnitten. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Größere Stücke der Vollhaut wurden über Nacht bei 4°C in Puffer (PBS, 10 mM EDTA, 1x Roche „cOmplete, Mini, EDTA-free: Protease Inhibitor Cocktail Tablets“) mit der Epidermis nach unten inkubiert. Danach konnte die Epidermis von der Dermis durch einfaches Abziehen getrennt werden. Die überschüssige Feuchtigkeit auf der Epidermis wurde mit Papier aufgenommen und die Epidermis bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für den Kallus wurde aus der Fußpflege von verschiedenen Individuen stammende Hornhaut (Stratum corneum) vereinigt, von Nagelresten befreit und durchgesiebt. Das feine Pulver wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Extraktion der Proteine erfolgte mit einem Puffer aus 30 mM Tris pH 8,5, 7 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff sowie verschiedenen Detergenzien, mit und ohne 5 mM Dithiotreitol. Die Extraktion erfolgte sequenziell. Im ersten Schritt wurden auf je 100 µg Vollhaut, Epidermis oder Kallus 400 µL des entsprechenden Lysispuffers ohne Reduktionsmittel gegeben. Der Aufschluss erfolgte im Homogenisator FastPrep-24 mit Hilfe von sechs Keramikugeln mit einem Durchmesser von 2,8 mm. Bei einer Geschwindigkeit von 6 m/s wurden die Proben 5 x 20 s behandelt. Zwischen den Intervallen wurden die Proben für 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 5 min bei 20800 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Aufgrund der immunhistologischen Befunde und früherer RNA-Analysen, wurde die Haarwurzel als der Ort mit der höchsten Konzentration an Trichohyalin-like1 identifiziert. Haarwurzeln wurden durch Epilieren oder durch Haarentfernung mit Kaltwachs gewonnen. Die Haare wurden nach deren Entfernung auf eine maximale Länge von 5 mm gekürzt, sodass neben den Haarwurzeln nur ein kurzer Anteil des Haares verwendet wurde. Die Lagerung der Haare erfolgte bei -20°C. Aufgrund der kompakten Struktur des Haares wurde versucht, mit Hilfe von Proteasen Fragmente des Trichohyalin-like1 aus den Haarwurzeln zu gewinnen. Dazu wurden jeweils ca. 10 mg Haarwurzeln in 100 µL 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,8 mit entsprechenden Proteasen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit SDS (Endkonzentration 2 % (w/v)) versetzt. Alternativ dazu wurden die Proben

schon während der Proteasebehandlung mit 2 % SDS versetzt, obwohl nach Angaben der Hersteller der Proteasen bei Konzentrationen von mehr als 0,02 % SDS für Asp-N und 0,2 % SDS für Lys-C die Proteasen nicht mehr aktiv sind. Neben dem enzymatischen Aufschluß wurde mit RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 1 % Na-deoxycholate, 1x Roche „cOmplete, Mini, EDTA-free: Protease Inhibitor Cocktail Tablets“, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) versucht, das Protein aus den Haarwurzeln zu extrahieren. Dazu wurden die Haarwurzeln mit dem RIPA-Puffer über Nacht bei RT inkubiert. Alle Proben wurden nach der Inkubation wie beschrieben homogenisiert und der Überstand nach Zentrifugation weiter analysiert.

4.5.2 Proteinmengenbestimmung

4.5.2.1 Spektrometrische Proteinbestimmung

Die Messung der Absorption von Proteinlösungen bei einer Wellenlänge von 280 nm beruht im Wesentlichen auf dem Absorptionsvermögen der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. Zu einem vernachlässigbar geringen Anteil absorbieren auch Phenylalanin und die Disulfidbrücke im Cystin. Neben den Proteinen enthalten auch Nukleotide aromatische Systeme. Diese absorbieren ebenfalls in dem Wellenlängenbereich um 280 nm und können somit die Messergebnisse beeinflussen. Die Messungen wurden nur für gereinigte Proteine durchgeführt, bei denen davon ausgegangen wurde, dass sie keine Nukleinsäuren mehr enthielten. Als Indikator der Reinheit kann der Koeffizient aus der Absorption bei 260 nm / 280 nm verwendet werden. Liegt dieser zwischen 0,8 und 0,6 kann von einer Reinheit zwischen 95 und 100% ausgegangen werden. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Extinktion, also die Abschwächung von Strahlung, beim Durchgang durch eine Lösung durch Absorption, Streuung, Beugung und Reflektion bestimmt. Die Streuung und Beugung spielen bei Lösungen ohne korpuskuläre Bestandteile keine Rolle und können vernachlässigt werden. Um den Anteil der Reflektionsverluste zu berücksichtigen, wurden Leerwertmessungen mit identischen Behältnissen und Puffern durchgeführt. Unter diesen Voraussetzungen gilt:

$$E_{280 \text{ nm}} = \varepsilon_{280 \text{ nm}} \cdot c \cdot d$$

Dabei ist die Extinktion bei 280 nm ($E_{280 \text{ nm}}$) gleich dem Produkt aus dem dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten ($\varepsilon_{280 \text{ nm}}$) in $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, der Konzentration (c) in M und der Schichtdicke (d) in cm. Der dekadische molare Extinktionskoeffizient ist für eine spezifische Substanz in

einem Lösungsmittel (mit konstanter Zusammensetzung, konstantem pH und konstanter Temperatur) für eine definierte Wellenlänge konstant. Anhand der Aminosäurezusammensetzung lässt sich der molare Extinktionskoeffizient berechnen (Gill und von Hippel, 1989). Dieses wurde für alle rekombinanten Proteine anhand des ProtParam Programms (Abschnitt 4.1) durchgeführt. Wie eingangs erwähnt, ist für die spektrometrische Bestimmung der Proteinkonzentration das Vorhandensein der Aminosäuren Tryptophan und / oder Tyrosin und / oder das Vorhandensein von Disulfidbrücken erforderlich. Der Zusammenhang des Lambert-Beerschen Gesetzes gilt nur im linearen Bereich bei einer Extinktion zwischen 0,01 und 1,0. Befanden sich die Konzentrationen der zu messenden Lösung außerhalb dieser Grenzen, wurden die Lösungen verdünnt oder aufkonzentriert. Die Messungen erfolgten in speziellen UV-lichtdurchlässigen Küvetten oder mit Hilfe des Nanodrops, bei dem die lichtleitenden Teile aus UV-durchlässigem Quarzglas bestehen. War keine der drei erforderlichen Aminosäuren in der Sequenz vorhanden, konnte eine Konzentrationsbestimmung mit dieser Methode nicht durchgeführt werden und es erfolgte die Konzentrationsbestimmung über kolorimetrische Konzentrationsbestimmung (Abschnitt 4.5.2.2).

4.5.2.2 Proteinbestimmung von komplexen Proteingemischen durch Färbetests

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in komplexen Gemischen unterschiedlicher Proteine und weiterer Zellbestandteile wurden quantitative Färbetests verwendet. Die kolorimetrische Konzentrationsbestimmung erfolgt durch Komplexbildung, Reduktion oder durch chemische Bindung. Die Bestimmung ist besonders von der Aminosäurezusammensetzung und der Sequenz abhängig. Dabei wird bei komplexen Mischungen davon ausgegangen, dass sich diese Limitierungen aufgrund der statistischen Verteilung aller Aminosäuren sowohl hinsichtlich Frequenz als auch Sequenz aufheben, was allerdings so nicht für alle Proteine unter realen Gegebenheiten entsprechen muss. Ein großes Problem bei allen kolorimetrischen Verfahren sind Limitierungen durch die in der Lösung enthaltenen, aber für die Proteinextraktion notwendigen Substanzen wie z. B. Säuren und Basen, Puffersubstanzen, Detergenzien oder Reduktionsmittel. Ein Verdünnen der störenden Substanzen ist aufgrund des begrenzten Messbereichs der kolorimetrischen Verfahren oftmals nicht möglich. Eine sehr gute Übersicht über die hierfür notwendigen Informationen und Entscheidungspfade findet man bei Olson und Markwell (Olson und Markwell, 2007). Im Folgenden werden die drei verwendeten Verfahren kurz erläutert.

Bradford-Test (Bradford, 1976)

Bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist demnach ein Maß für die Proteinkonzentration. Nachteile dieser Methode bestehen in dem niedrigem pH-Wert, bei dem viele Proteine ausfallen. Zudem ist diese Methode sehr empfindlich gegenüber störenden Detergenzien wie SDS, CHAPS oder Triton X-100.

Für die Proteinbestimmung wurde das 5-fach konzentrierte Bradfordreagenz (0,125 g Coomassie Brilliant Blue CBB G250, 60 mL Ethanol (99,8 %, unvergällt), 125 mL Phosphorsäure (85 %); mit TKA-Wasser ad 250 mL, Lagerung bei 4°C) mit Wasser 1:5 verdünnt. 995 µL dieser Lösung wurden in einer Halbmikroküvette vorgelegt und 5 µL des Leerwertes, des Standards oder der Probe zugegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt, 5 bis 10 min bei RT inkubiert und nach erneutem Durchmischen bei 595 nm gemessen. Als Protein für die Standardreihe wurde BSA verwendet. Die Standardreihe wurde in sechs Verdünnungsstufen im Bereich zwischen 100 und 1500 µg/mL erstellt.

Bicinchoninsäure (BCA)-Test (Smith et al., 1985)

In alkalischer Lösung bilden Proteine mit Cu^{2+} -Ionen Komplexe. Dabei wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert und bildet mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, der als Maß der Proteinkonzentration dient und bei 562 nm bestimmt wird. Bei diesem Test stören hohe Konzentrationen von Komplexbildnern, außerdem Glycin und reduzierende Stoffe wie z. B. DTT. Zu Beginn wurde die Arbeitslösung durch das Vermischen von 20 µL des Reagenz B pro 1 mL des Reagenz A (Bicinchoninic Acid Kit von Sigma-Aldrich) hergestellt. Für die Proteinbestimmung wurden 20 µL Probe, Leerwert oder Standard mit 600 µL der Arbeitslösung vermischt. Die Proben wurden bei 60°C und 350 rpm für 15 min inkubiert bevor sie bei 562 nm gemessen wurden. Als Protein für die Standardreihen wurde BSA verwendet. Eine Standardreihe wurde in acht Verdünnungsstufen im Bereich zwischen 25 und 2000 µg/mL erstellt.

Lowry-Test (Lowry et al., 1951)

Ähnlich wie im BCA-Test bilden Cu^+ -Ionen aus der Biuret-Reaktion mit dem gelben Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) einen wenig stabilen blauen Komplex. Dieser dient ebenfalls als Maß der Proteinkonzentration und kann aufgrund der Absorption bei 750 nm bestimmt werden. Der Lowry-Test ist im Verhältnis zu den anderen

Tests relativ aufwendig und wird durch viele Substanzen (Mercaptoethanol, HEPES, Glycin, Citrat, Triton X-100, Tween 20) gestört. Als Protein für die Standardreihe wurde BSA verwendet. Die Standardreihe wurde in sechs Verdünnungsstufen im Bereich zwischen 100 und 1500 µg/mL erstellt. Verwendet wurde ein abgewandelter Lowry-Test (DC Protein Assay von Bio-Rad), der eine höhere Kompatibilität zu verschiedenen Detergenzien aufweist. Zu Beginn wurde die Arbeitslösung durch das Vermischen von 20 µL Reagenz S pro 1 mL Reagenz A hergestellt. Für die Proteinbestimmung wurden 20 µL Probe, Leerwert oder Standard mit 100 µL der Arbeitslösung vermischt. Anschließend wurden 800 µL Reagenz B zugegeben und durchmischt. Die Proben werden für 15 min inkubiert und dann bei 750nm gemessen.

4.5.3 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Eine elektrophoretische Trennung von Proteingemischen ist unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes möglich. Dabei wandern Moleküle, Aggregate oder Partikel in diesem Feld zu der Elektrode mit der entgegengesetzten Ladung. Die Mobilität ist abhängig von der Ladung und der molekularen Masse sowie dem hydrodynamischen Radius. Die elektrophoretische Trennung kann in freier Lösung („free flow electrophoresis“), als Kapillarelektrophorese oder in einer stabilisierenden Matrix (Papier, Dünnschichtfilme, Membranen, Gele) stattfinden. Bei einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese werden Acrylamid und Methylenbisacrylamid als Matrix genutzt. Verwendet wurden diskontinuierliche Gelsysteme, bei denen zwischen einem Sammelgel mit größeren Poren und dem eigentlichen Trenngel mit kleineren Poren sowie zwei Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten sowohl für das Gel als auch für die Elektrophorese unterschieden wird. Außerdem werden denaturierende Gele, welche ein Detergenz, z. B. das anionische Natriumlaurylsulfat (SDS) oder das kationische Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), enthalten, und native Gele, bei denen kein Detergenz verwendet wird, voneinander unterschieden. Sind in den Proteinen der Probe Disulfidbrücken vorhanden, so können diese in Gegenwart von DTT oder TCEP reduziert werden.

Die klassische SDS-PAGE-Analyse nach Ornstein (Ornstein, 1964), Davis (Davis, 1964), Shapiro *et al.* (Shapiro *et al.*, 1967) und Laemmli (Laemmli, 1970) wurde dahingehend abgewandelt, dass in das Trenngel Glycerol gegeben wurde, damit das noch flüssige Trenngel bereits vor der Aushärtung mit dem weniger dichteren Sammelgel überschichtet werden konnte. Zur Anwendung kamen je nach erforderlichem Auftrennungsbereich unterschiedliche Konzentrationen von Polyacrylamid (nachfolgende Tabelle).

Sammelgel (4 %) Gesamt volumen pro Gel: 2 mL

| | |
|---|---------|
| TKA-H ₂ O | 1240 µL |
| 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 (finale Konzentration: 0,375 M) | 500 µL |
| 39 % Acrylamid (Mr 71,08), 0,8 % N,N'-Methylen-bisacrylamid (Mr 154,17) Verhältnis 37,5:1 (T=40 %; C=2,6 %) | 200 µL |
| 10 % SDS (finale Konzentration: 0,1 %) | 20 µL |
| TEMED | 2,5 µL |
| 10 % APS | 40 µL |

Trenngel (5 - 15 %) Gesamt volumen pro Gel: jeweils 5 mL

| linearer Trennbereich | <u>5 %</u> Mr = 36-200 k | <u>7,5 %</u> Mr = 24-200 k | <u>10 %</u> Mr = 14-200 k | <u>12,5 %</u> Mr = 14-100 k | <u>15 %</u> Mr = 14-60 k |
|--|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| TKA-H ₂ O | 2450 µL | 2137 µL | 1825 µL | 1512 µL | 1200 µL |
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (final Konzentration: 0,375 M) | 1250 µL | 1250 µL | 1250 µL | 1250 µL | 1250 µL |
| 39 % Acrylamid (Mr 71,08), 0,8 % N,N'-Methylen-bis-acrylamid (Mr 154,17) Verhältnis 37,5:1 (T=40 %; C=2,6 %) | 625 µL | 938 µL | 1250 µL | 1563 µL | 1875 µL |
| Glycerol 87 % | 575 µL | 575 µL | 575 µL | 575 µL | 575 µL |
| 10 % SDS (finale Konzentration: 0,1 %) | 50 µL | 50 µL | 50 µL | 50 µL | 50 µL |
| TEMED | 3,5 µL | 3,0 µL | 2,5 µL | 2,0 µL | 1,5 µL |
| 10 % APS | 50 µL | 50 µL | 50 µL | 50 µL | 50 µL |

Vor Beginn wurden die Glasplatten und der Kamm für die Geltaschen mit 1 %iger SDS-Lösung gereinigt und gut mit VE-Wasser abgespült. Dann wurden die Glasplatten mit Aceton von lipophilen Stoffen gesäubert. Die Gelkammern wurden zusammengebaut und auf Dichtigkeit überprüft. Die oben angegebenen Lösungen wurden bis auf das APS zusammenpipettiert und vorsichtig ohne Bildung von Schaum vollständig durchmischt. Die Polymerisationsreaktion wurde durch die Zugabe von APS zuerst im Trenn- und dann im Sammelgel gestartet. Dann wurden zügig, aber ohne Luftblasen, zuerst 4,5 mL des Trenngels in die Gelkassette pipettiert und diese dann vorsichtig mit 1,6 mL des Sammelgels überschichtet. Dabei wurde darauf geachtet, die Durchmischung so gering wie möglich zu halten. Abschließend wurde in das Sammelgel der in 70 %iges Ethanol getauchte Kamm gesteckt, wobei auch hier darauf geachtet wurde, keine Luftblasen mit einzuschließen.

Als Proben- und Laufpuffer wurden die folgenden Lösungen verwendet.

4x Probenpuffer

| | | |
|--|--------|-------------------------|
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 | 5,0 mL | = 0,75 M (0,1875 M) |
| SDS | 0,4 g | = 4 % (w/v) (1 %) |
| Glycerol 87 % | 4,6 mL | = 40 % (10 %) |
| 5 % Bromphenol Blau-Lösung (w/v in TKA-H ₂ O) | 80 µL | = 0,04 % (w/v) (0,01 %) |

Durch Zugabe von 20 mM DTT kann der Probenpuffer auch unter reduzierenden Bedingungen eingesetzt werden.

10x Laufpuffer

| | | |
|------------------------------|---------|---------------------|
| Tris (Mr 121,14) | 30,29 g | = 250 mM (25 mM) |
| Glycin (Mr 75,07) | 144 g | = 1920 mM (192 mM) |
| SDS (Mr 288,38) | 10 g | = 1 % (w/v) (0,1 %) |
| mit TKA-H ₂ O auf | 1 L | auffüllen |

Der pH Wert sollte zwischen 8,2 und 8,3 liegen, aber nicht eingestellt werden. Sollte SDS ausgefallen sein, muss erst die Lösung erwärmt und dann 1:10 mit TKA-H₂O verdünnt werden.

Die Peptid-Gele wurden in Anlehnung an Hashimoto *et al.* (Hashimoto *et al.*, 1983) und Anderson *et al.* (Anderson *et al.*, 1983) mit 8 M Harnstoff durchgeführt. Dabei ist die Trennung sehr kleiner Peptide zwischen 2 kDa und 90 kDa möglich. Auch hier wurde ein diskontinuierliches System verwendet.

Sammelgel (5 %) Gesamtvolumen pro Gel: 2 mL

| | |
|--|---------|
| TKA-H ₂ O | 1455 µL |
| 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 (finale Konzentration: 0,0625 M) | 250 µL |
| 39 % Acrylamid (Mr 71,08), 0,8 % N,N'-Methylen-bisacrylamid (Mr 154,17) Verhältnis 37,5:1 (T=40 %; C=2,6 %) | 250 µL |
| 10 % SDS (finale Konzentration: 0,1 %) | 20 µL |
| TEMED | 2 µL |
| 10 % APS | 20 µL |

Trenngel (8 %) Gesamtvolumen pro Gel: 5 mL

| | |
|--|---------|
| Harnstoff (Mr 60,06) (finale Konzentration: 8 M) | 2,4 g |
| TKA-H ₂ O | 2400 µL |
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (finale Konzentration: 0,45 M) | 1500 µL |
| 37,5 % Acrylamid (Mr 71,08), 2,1 % N,N'-Methylen-bisacrylamid (Mr 154,17) Verhältnis 19:1 (T=40 %; C=5 %) | 1000 µL |
| 10 % SDS (finale Konzentration: 0,1 %) | 50 µL |
| TEMED | 5 µL |
| 10 % APS | 50 µL |

Das Vorgehen bei der Gelpräparation entsprach dem bei der klassischen SDS-PAGE. Der Laufpuffer entspricht dem oben angegebenen Tris/ Glycin Puffer, im Auftragungspuffer wurde das Glycerol durch die gleiche Menge Saccharose (40% w/v) ersetzt.

Neben dem bereits erwähnten System wurde auch in Anlehnung an Schägger und von Jagow (Schägger und von Jagow, 1987) ein weiteres System für Peptide und kleine Proteine verwendet. Hierbei wurde im Kathodenpuffer das Glycin durch Tricin ersetzt sowie ein zusätzliches Abstandsgel zwischen Trenn- und Sammelgel eingefügt.

Sammelgel (4 % T, 2,6 % C) Gesamtvolumen pro Gel: 2 mL (1-2 cm)

| | |
|--|---------|
| TKA-H ₂ O | 1240 µL |
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (finale Konzentration: 0,375 M) | 500 µL |
| 37,5 % Acrylamid (Mr 71,08), 1,3 % N,N'-Methylen-bisacrylamid (Mr 154,17) Verhältnis 29:1 (T=40 %; C=2,6 %) | 200 µL |
| 10 % SDS (finale Konzentration: 0,1 %) | 20 µL |
| TEMED | 5 µL |
| 10 % APS | 40 µL |

Zwischengel (10 % T, 2,6 % C) Gesamtvolumen pro Gel: 2 mL (2-3cm)

| | |
|--|--------|
| TKA-H ₂ O | 940 µL |
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (finale Konzentration: 0,375 M) | 500 µL |
| 37,5 % Acrylamid (Mr 71,08), 1,3 % N,N'-Methylen-bisacrylamid (Mr 154,17) Verhältnis 29:1 (T=40 %; C=2,6 %) | 500 µL |
| 10 % SDS (finale Konzentration: 0,1 %) | 20 µL |
| TEMED | 2 µL |
| 10 % APS | 20 µL |

Trenngel (16,5 % T, 5 % C) Gesamtvolumen pro Gel: 5 mL

| | |
|--|---------|
| TKA-H ₂ O | 1200 µL |
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (finale Konzentration: 0,375 M) | 1250 µL |
| 37,5 % Acrylamid (Mr 71,08), 2,1 % N,N'-Methylen-bisacrylamid (Mr 154,17) Verhältnis 19:1 (T=40 %; C=5 %) | 1875 µL |
| Glycerol 87 % | 575 µL |
| 10 % SDS (finale Konzentration: 0,1 %) | 50 µL |
| TEMED | 2 µL |
| 10 % APS | 20 µL |

Das Vorgehen bei der Gelpräparation entsprach dem bei der klassischen SDS-PAGE. Es wurden 3,5 mL Trenngel eingefüllt und vorsichtig mit 1,2 mL des Zwischengels überschichtet. Dabei wurde darauf geachtet, die Durchmischung so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurde vorsichtig mit 60 %igem 2-Propanol überschichtet. Das 2-Propanol wurde vom auspolymerisierten Gel abgegossen und das Gel mit Wasser gespült. Anschließend wurde mit Sammelgel aufgefüllt und der Kamm plziert.

3x Probenpuffer

| | | |
|---|---------|--------------------|
| 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 | 3,33 mL | = 0,15 M (0,05 M) |
| SDS | 1,2 g | = 12 % (w/v) (4 %) |
| Glycerol 87 % | 4,14 mL | = 36 % (12 %) |
| 5 % Bromphenol Blue (w/v in H ₂ O) | 60 µL | = 0,03 % (0,01 %) |
| mit TKA-H ₂ O auf | 10 mL | auffüllen |

Durch Zugabe von 15 mM DTT kann der Probenpuffer auch unter reduzierenden Bedingungen eingesetzt werden.

10x Anodenpuffer

| | | |
|--|----------|---------------------|
| Tris (Mr 121,14) | 242,28 g | = 2 M (0,2 M) |
| SDS (Mr 288,38) | 10 g | = 1 % (w/v) (0,1 %) |
| mit TKA-H ₂ O auf | 800 mL | auffüllen |
| den pH-Wert mit 4 M HCl auf 8,9 einstellen | | |
| mit TKA-H ₂ O auf | 1 L | auffüllen |

Sollte SDS ausgefallen sein, muss erst die Lösung erwärmt und dann 1:10 mit TKA-H₂O verdünnt werden.

10x Kathodenpuffer

| | | |
|------------------------------|----------|---------------------|
| Tris (Mr 121,14) | 24,228 g | = 0,2 M (0,02 M) |
| Tricin (Mr 179,2) | 286,72 g | = 1,6 M (0,16 M) |
| SDS (Mr 288,38) | 10 g | = 1 % (w/v) (0,1 %) |
| mit TKA-H ₂ O auf | 1 L | auffüllen |

Sollte SDS ausgefallen sein, wurde die Lösung erwärmt und dann 1:10 mit TKA-H₂O verdünnt.

4.5.4 Proteinfärbungen

Um die Proteine nach der Auftrennung sichtbar zu machen, wurden verschiedene Färbemethoden eingesetzt. Da die Empfindlichkeit bei allen eingesetzten Verfahren mindestens im unteren zweistelligen Nanogrammbereich liegt, ist eine hohe Reinheit der verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sowie die Verwendung von Protein-freien Handschuhen besonders wichtig.

4.5.4.1 Färbung mit kolloidalem Coomassie

Die Methode ist angelehnt an die Arbeit von Kang *et al.*. Unter sauren Bedingungen bindet das Anion des Coomassie brillant blau G-250 an die NH₃⁺-Gruppen des Proteins (Fazekas de St Groth *et al.*, 1963). Zusätzlich werden die Farbstoffmoleküle durch Van-der-Waals Wechselwirkungen untereinander zusammen gehalten. Durch die Verwendung von Aluminiumsulfat und Ethanol wird die Sensitivität um mehr als den Faktor 10 gesteigert und die Färbung auf 2 h verkürzt (Kang *et al.*, 2002). Für die Färbelösung wurden 50 g Aluminiumsulfat-Hydrat (14-18) (finale Konzentration 5 % (w/v)) in 500 mL TKA-H₂O und 100 mL 96 %igen Ethanol (finale Konzentration 10 % (v/v)) gelöst; dazu wurden anschließend 200 mg Coomassie brillant blau G-250 (finale Konzentration 0,02 % (w/v)) gegeben. Nach vollständigem Auflösen des Aluminiumsulfats wurden 20 g einer 85 %igen ortho-Phosphorsäure (finale Konzentration 2 % (v/v)) zugegeben und mit TKA-H₂O auf 1 L aufgefüllt.

Die Lösung wurde in einer braunen Flasche bei Raumtemperatur gelagert. Für eine Entfärbelösung wurden 100 mL 96 %igen Ethanol (finale Konzentration 10 % (v/v)), 20 mL ortho-Phosphorsäure (finale Konzentration 2 % (v/v)) mit TKA-H₂O auf 1 L aufgefüllt. Für die Färbung wurden die Gele nach der Elektrophorese mindestens zweimal 10 min mit TKA-H₂O gewaschen, um das SDS vom Gel zu entfernen. Die Färbelösung wurde geschüttelt, so dass sich die kolloidalen Partikel in der Lösung verteilen, und dann auf das Gel gegeben. Die Färbung erfolgte für mindestens 2 h oder über Nacht. Die benutzte Färbelösung wurde verworfen, das Gel zweimal mit TKA-H₂O gewaschen und dann für 10 bis 60 min mit der Entfärbelösung behandelt. Abschließend wurde das Gel zweimal mit TKA-H₂O gewaschen.

4.5.4.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach dem Protokoll von Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven und Dernick, 1985, 1988). Dabei ist das zugrundeliegende Prinzip sehr einfach. Proteine binden Silberionen, die unter geeigneten Bedingungen zu einem sichtbaren Niederschlag aus metallischem Silber reduziert werden. Im Gegensatz zu organischen Farbstoffen, widerspricht die Silberfärbung allerdings der allgemeinen Thermodynamik, da die Bindung der Silberionen an die Proteine die Reaktivität der Ionen verringert. Dieses generelle Phänomen ist eine Erklärung für die sogenannten „hollow“ oder „doughnut“ Banden. Jede Veränderung die die Reduktion der Silberionen am Protein steigert, führt zu einer verbesserten Sensitivität (Chevallet et al., 2006). Alle Schritte wurden auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer mindestens 30 min dauernden Fixierung (30 % Ethanol, 10 % Eisessig in TKA-H₂O) erfolgte eine Reduktion für 30 min mit „Farmers Reducer“ (30 % Ethanol, Acetatpuffer pH 6,0 (0,43 % Essigsäure 0,4 M Natriumacetat), 0,1 % Natriumthiosulfat, 0,5 % Glutaraldehyd in TKA-H₂O). Anschließend wurde dreimal für 10 min mit TKA-H₂O gewaschen und dann mit Silbernitrat (0,1 % Silbernitrat, 0,25 % Formaldehyd in TKA-H₂O) für 30 min angefärbt. Die Entwicklung erfolgte, indem zuerst eine kleine Menge der Entwicklerlösung (2,5 % Dinatriumcarbonat, 0,4 % Formaldehyd in TKA-H₂O) zu dem Gel gegeben wurde, bis sich elementares Silber in der Lösung bildete. Diese Lösung wurde verworfen und mit neuer Lösung weiter entwickelt, bis Banden sichtbar wurden. Die Entwicklerlösung wurde verworfen und mit Stopplösung (5 % Essigsäure in TKA-H₂O) die Reaktion beendet.

4.5.4.3 Zink-Imidazol-Negativ Färbung

Bei der Negativfärbung wird der Hintergrund des Gels gefärbt, während die Positionen in den Laufspuren, an denen Proteine oder auch andere Biomoleküle im Gel vorliegen, transparent bleiben. Das verwendete Protokoll basiert auf den von Fernandez-Patron (Fernandez-Patron, 2002) veröffentlichten Angaben. Die Zink-Imidazol-Färbung beruht auf der Eigenschaft der Biopolymere, Zn^{2+} zu binden, während das Imidazol mit dem ungebundenen Zn^{2+} reagiert und unlösliche weiße Verbindungen bildet. Zu Beginn wurde das Gel für 15 min in der Equilibrierungslösung inkubiert. Dazu wurde die 10x-Equilibrierungslösung (13,62 g Imidazol (finale Konzentration nach der Verdünnung 0,2 M), 10 mL 10 %ige SDS-Lösung (finale Konzentration nach der Verdünnung 0,1 %) aufgefüllt mit TKA- H_2O auf 100 mL) direkt vor der Verwendung mit TKA- H_2O 1:10 verdünnt. Anschließend wurde mit der Entwicklerlösung für 30 bis 40 s gefärbt. Die 10x-Entwicklerlösung (86,27 g Zinksulfat-Heptahydrat (finale Konzentration nach der Verdünnung: 0,3 M) aufgefüllt mit TKA- H_2O auf 100 mL) wurde direkt vor der Verwendung mit TKA- H_2O 1:10 verdünnt. Eine Überfärbung wurde durch sofortiges Abgießen der Entwicklerlösung und drei- bis fünfmaliges einminütiges Waschen des Gels mit TKA- H_2O verhindert. Danach erfolgte die Dokumentation der Gele mit einem Durchlichtscanner. Für weitere Untersuchungen wurden die Gele in Lagerungslösung umgepuffert. Die 10x Lagerungslösung (5 g Natriumcarbonat (finale Konzentration nach der Verdünnung: 0,5 % (w/v)), aufgefüllt mit TKA- H_2O auf 100 mL) wurde direkt vor der Verwendung mit TKA- H_2O 1:10 verdünnt.

4.6 Chromatographie

Für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen, Antikörpern oder komplexen Gemischen wurden verschiedene chromatographische Trennverfahren verwendet. Diese wurden entweder als „High Performance Liquid Chromatographie“ (HPLC) oder als „Fast Protein Liquid Chromatography“ (FPLC) durchgeführt. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden besteht in dem Druck, der bei der Trennung maximal auftritt, ohne dass es zu einer Schädigung der verwendeten Säule kommt. Dieser liegt bei der HPLC bei maximal 400 bar für die Säulen der Umkehrphasen-Chromatographie während er bei der FPLC je nach verwendeter Säule zwischen 3 bar für viele Affinitätssäulen und 40 bar für einige Ionentauschersäulen liegt.

4.6.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eine chromatographische Reinigungsmethode für Biomoleküle, die auf der spezifischen und reversiblen Absorption eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Liganden basiert.

4.6.1.1 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Für die Aufreinigung rekombinanter Proteine, die über einen Hexahistidin in ihrem „Tag“ verfügten, wurde die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) verwendet. Hierbei sind Ni^{2+} -Ionen (oder andere zweiwertige Ionen wie z. B. Cu^{2+}) über eine Komplexbindung und einen Anker an die aus Sephadex bestehende Säulenmatrix gebunden. Über die sechs Histidine des „Tag“ erfolgt die Bindung an das Ni^{2+} . Die Elution des Proteins erfolgt durch eine steigende Konzentration an Imidazol, einem Struktur analog zum Histidin. Es wurden 5 mL des gefilterten Überstandes nach Ultraschallbehandlung und Zentrifugation (Abschnitt 4.4.6), die circa 50 mL der Expressionskultur mit einer OD_{600} von 3,5 entsprechen, mit der FPLC-Anlage auf eine His-Trap HP Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Dazu wurden ein Auftragungspuffer (20 mM Natriumphosphatpuffer + 500 mM Natriumchlorid pH 7,4) und ein Elutionspuffer (20 mM Natriumphosphatpuffer + 500 mM Imidazol + 500 mM Natriumchlorid pH 7,4) verwendet. Die Auftragung und das Spülen bis zum Erreichen der Basislinie erfolgten bei einer Konzentration von 20 mM Imidazol (4 % Elutionspuffer). Anschließend wurde die Konzentration des Imidazols innerhalb von 10 min auf 500 mM Imidazol (100 % Elutionspuffer) erhöht. Sowohl der Durchlauf mit den Proteinen aus *E. coli* als auch das Eluat mit dem Fusionsprotein wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert; eine langfristige Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.6.1.2 Immunglobulin-Affinitätschromatographie mit Protein G

Die Aufreinigung polyklonaler Antikörper erfolgte im ersten Schritt über eine Protein G-Säule. Hier ist an die aus Sepharose bestehende Säulenmatrix ein Protein aus Streptokokken der Gruppe G gebunden. Es handelt sich hierbei um einen Typ III Fc-Rezeptor, der den Fc-Teil des Immunglobulins G bindet. Die Elution des Antikörpers erfolgte bei einem sauren pH-Wert. Es wurden ein Auftragungspuffer (20 mM Natriumphosphat pH 7,0) und ein Elutionspuffer (100 mM Glycin-HCl pH 2,7) verwendet. Zu Beginn wurden 2,5 mL des polyklonalen Antiserums 1:1 (Abschnitt 4.9.1) mit dem Auftragungspuffer verdünnt. Unter Verwendung der FPLC-Anlage wurde das verdünnte Serum mit Auftragungspuffer auf eine HiTrap Protein G HP Säule (GE Healthcare) gebunden und der Durchlauf aufgefangen. Bis zum Erreichen der

Basislinie wurde mit Auftragungspuffer gespült. Anschließend wurde mit dem Elutionspuffer der Antikörper von der Säule abgelöst. Das Eluat wurde durch Zugabe von 200 µL 1 M Tris bei pH 9,0 neutralisiert, um so einer Denaturierung des Antikörpers vorzubeugen.

4.6.1.3 Affinitätschromatographie mit einem über NHS-gebundenen Antigen

Im zweiten Schritt der Aufreinigung des polyklonalen Antikörpers erfolgt eine Anreicherung oder Depletion über ein immobilisiertes Antigen. Zu diesem Zweck wurde das entsprechende Antigen kovalent an die aus Sepharose bestehende Säulenmatrix gebunden. Die chemische Bindung des Antigens erfolgt über eine primäre Aminogruppe (Amino-terminal, Lysin) des Proteins an die N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Gruppe, die über einen Anker an die Säulenmatrix gebunden ist. Die Kopplung an die HiTrap NHS activated HP Säule (GE Healthcare) erfolgte nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Für die Bindung wurde 1 mg des entsprechenden Proteins verwendet. Die Kopplungseffizienz lag immer bei mehr als 90 %. Zur Anwendung kamen ein Auftragungspuffer (20 mM Natriumphosphat pH 7,4), ein Waschpuffer (20 mM Natriumphosphat + 1 M Natriumchlorid pH 7,0) und ein Elutionspuffer (100 mM Glycin-HCl pH 2,7). Das von der Protein G-Säule neutralisierte Eluat wurde 1:1 mit dem Auftragungspuffer verdünnt und mit der FPLC-Anlage an eine Säule, die zuvor mit dem entsprechenden Protein beladen worden war, gebunden. Anschließend wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit Auftragungspuffer gespült und nachfolgend mit dem Waschpuffer gewaschen. Der dabei eluierte Antikörper wurde als „Low-Binding Fraktion“ gesammelt. Nach Erreichen der Basislinie wurde mit dem Elutionspuffer die „High-Binding Fraktion“ gesammelt und sofort durch Zugabe von 200 µL 1 M Tris pH 9,0 neutralisiert. Bei einer Depletion, also dem Entfernen von z. B. „Tag“ kreuzreaktiver Antikörpern wurde immer der Durchlauf weiterverwendet, da dieser die gewünschten Antikörper enthält, wohingegen das Eluat, die zu depletierenden Antikörper enthält. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Aufreinigung immer das neutralisierte Eluat weiterverwendet, da dieses die gewünschten Antikörper enthält.

4.6.1.4 Affinitätschromatographie mit einem über NHS-gebundenen Antikörper

Für die Isolierung des natürlichen TCHHL1 wurden gereinigte anti-TCHHL1 polyklonale Antikörper an eine HiTrap NHS-activated HP Säule (GE Healthcare) gebunden. Über diese Säule wurden unterschiedliche dermale Extrakte (Epidermis, Vollhaut, Kallus, Haarwurzeln) gegeben, mit 1 M NaCl gewaschen und mit 100 mM Glycin pH 2,7 eluiert.

In einem weiteren Versuch wurden die gleichen Extrakte mit dem gereinigten polyklonalen Antikörper inkubiert und die Antigen-Antikörper-Komplexe über eine HiTrap Protein G HP Säule (GE Healthcare) isoliert.

4.6.2 Gelpermeationschromatographie/ Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie, oder auch Größenausschlusschromatographie genannt, beruht auf dem Prinzip, dass kleine Moleküle in Poren in der Säulenmatrix eindringen können und so einen längeren Weg durch die Säule zurücklegen, während größere Moleküle dieses nicht können und so früher von der Säule eluiert werden. Dabei ist die Größe der abzutrennenden Moleküle von der Ausschlussgröße, die durch das Material der Säulenmatrix bestimmt wird, abhängig. Die Gelpermeationschromatographie wurde für die Entsalzung von Fraktionen nach der Affinitätschromatographie verwendet. Die verwendete HiPrep 26/10 Desalting-Säule (GE Healthcare) besteht aus vernetztem Dextran und hat eine Ausschlussgrenze von 5000 Da. Als Laufmittel wurde der für den sich anschließenden Schritt der Aufreinigung notwendige Puffer oder TKA-H₂O gewählt.

4.6.3 Umkehrphasen-Chromatographie mit Ionenpaarreagenz

Bei der Umkehrphasen-Chromatographie („reversed phase (RP) chromatography“) kommt es zu van der Waals-Wechselwirkungen zwischen unpolaren Molekülen oder Molekülteilen der Probe und den Alkylketten der stationären Phase. Die Elution erfolgt durch einen steigenden Anteil an organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Acetonitril oder 2-Propanol in der mobilen Phase. Da Proteine als amphothere Moleküle aus zwitterionischen Aminosäuren bestehen, kann hierbei von einer Mischung aus Säuren, Basen und Neutralstoffen gesprochen werden. Diese lassen sich mit einer Umkehrphasen-Chromatographie nur bedingt trennen. Deshalb wird durch den Einsatz von Ionenpaarreagenzien der amphotere Charakter der Proteine beeinflusst. Durch geeignete pH-Wahl (pH < 2,8) wird erreicht, dass die Proteine in der undissoziierten, nahezu vollständig protonierten Form vorliegen (Ionenunterdrückung). Durch Zugabe eines Ionenpaarreagenz (Trifluoressigsäure) zur mobilen Phase bildet dieses mit den entgegengesetzt geladenen Seitenketten des Proteins ein Ionenpaar (Ionenmaskierung). Unter diesen Bedingungen ist eine Trennung mit der Umkehrphasen-Chromatographie möglich. Es wurden die folgenden Säulen verwendet: Als Säulen mit „Endcapping“ wurden die Jupiter C4 5 µm 300 Å 4,60 x 250 mm (Phenomenex) und die Jupiter C18 5 µm, 300 Å, 4,60 x 250 mm & 10 x 250 mm (Phenomenex) verwendet. Beim Encapping werden die nicht mit der

eigentlichen Phase besetzten Silanolgruppen durch Trimethylsilan modifiziert, so dass keine polaren Gruppen mehr erhalten bleiben. Als Säule ohne „Endcapping“ wurde eine Nucleosil C8 7 μm 300 Å 10 x 250 mm (Macherey & Nagel) verwendet. Als Laufmittel dienten TKA-H₂O mit 0,05 % Trifluoressigsäure und 80 % Acetonitril / TKA-H₂O oder 80 % 2-Propanol / TKA-H₂O mit jeweils 0,05 % Trifluoressigsäure. Die Laufmittel-Gradienten wurden für die jeweiligen Trennprobleme optimiert.

4.7 Massenspektrometrie (MS)

Als Massenspektrometer wurde ein Q-ToF 2 von Micromass/ Waters verwendet (Abb. 11). Für die MS/ MS-Analyse, also die Untersuchung von Ionen (MS1), die nachfolgende Fragmentierung und die Untersuchung (MS2) dieser neuen Ionen, wurde der Nano-Spray-Modus verwendet. Die Ionisation erfolgte hauptsächlich im Positiv-Modus unter Verwendung von 0,2 % Ameisensäure als Protonenquelle. Im Positiv-Modus sind die Analyten durch die Übertragung von Protonen positiv geladen und werden anhand eines Potentialverlaufs von der Ionenquelle zum Detektor beschleunigt. Anhand der aus der Flugzeit und dem Signal am MCP entstehenden Spektren, bei denen auf der X-Achse die Flugzeit und auf der Y-Achse die Intensität aufgetragen ist, kann nach Kalibrierung des Gerätes mit den Signalen der Ionen eines bekannten Stoffes die Flugzeit durch das Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) ersetzt werden.

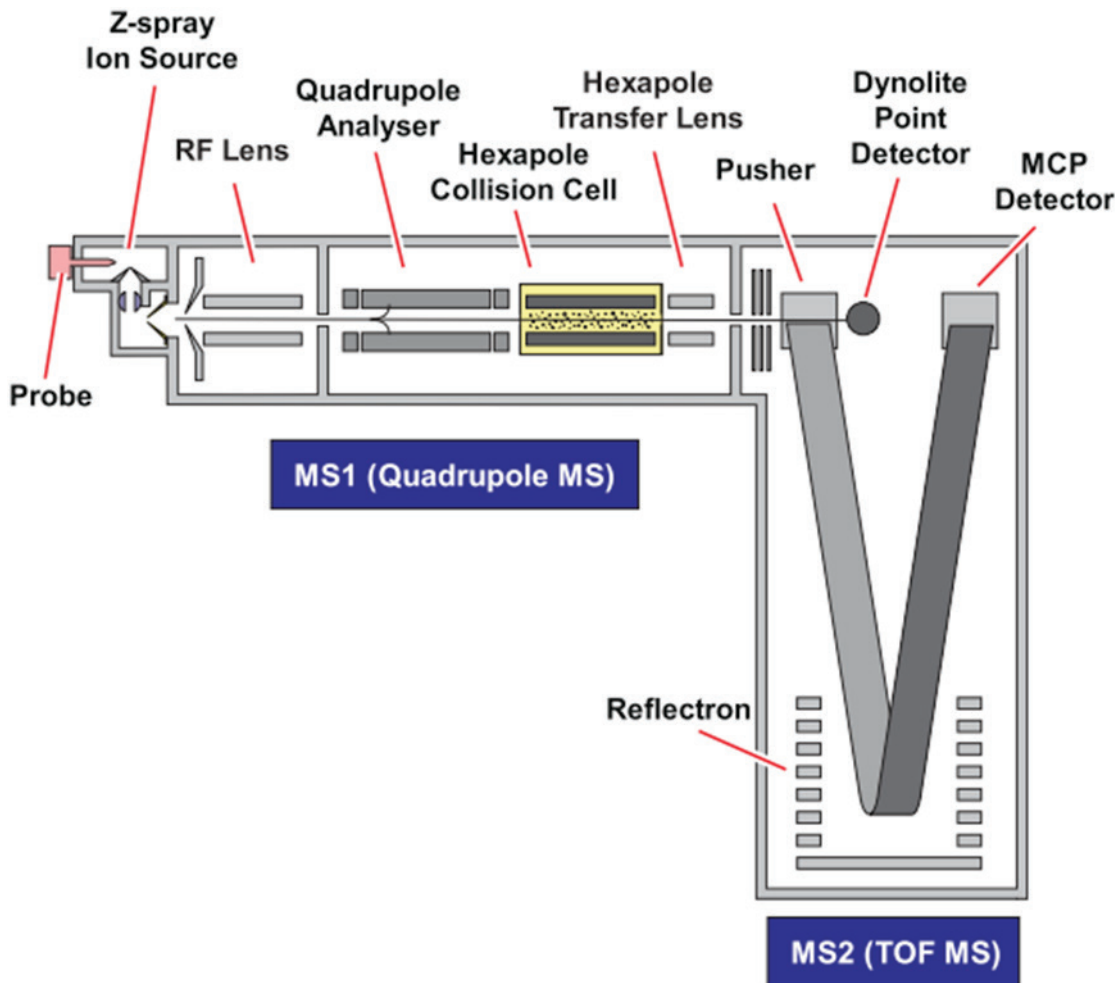


Abb. 11: Schematischer Aufbau des Q-ToF 2 Massenspektrometers. Die „Probe“ bezeichnet das Ionisationsverfahren, das entweder in Form von Elektrospray (ESI) oder Nano-Elektrospray, bei dem Metallbedampfte Einweg-Glaskapillaren für den Spray verwendet werden, erfolgt. Diese beiden Methoden unterscheiden sich in der Fließgeschwindigkeit mit der der Analyt in das Gerät eingebracht wird: Elektrospray 5-50 $\mu\text{l}/\text{min}$, Nano-Spray 5-1000 nl/min . Die „Z-spray Ion Source“ bezeichnet den Teil der Ionenquelle der das eigentliche Einlasssystem darstellt. In diesem Teil werden ungeladene oder nicht ausreichend geladene Moleküle abtrennt und so die Verschmutzung des Gerätes minimiert. Die „RF-Lens“ ist eine elektromagnetische Linse, die über ein hochfrequentes („radio frequency“ RF) Wechselfeld den Ionenstrahl bündelt. Der „Quadrupol Analyser“ bezeichnet den ersten Analysator des Massenspektrometers (MS1). Durch ein angelegtes hochfrequentes Wechselfeld findet eine m/z -Selektion statt. Die „Hexapole Collision Cell“ ist eine vom restlichen MS abgetrennte Einheit, die ein RF-Hexapol enthält, in die ein Kollisionsgas (Argon) eingeleitet werden kann um eine Fragmentierung der Ionen zu erreichen. Die „Hexapole Transfer Lens“ beschleunigt die Ionen und leitet sie über ein fokussierendes Linsensystem zum „Pusher“ weiter. Der „Pusher“ sammelt die Ionen und entlässt sie mit einer Frequenz von bis zu 20 kHz in den zweiten Analysator des Massenspektrometers (MS2), den Flugzeitanalysator (ToF), wo sie im „Reflectron“ reflektiert werden und dann auf den „Micro Channel Plate (MCP) Detector“ - einen Sekundärelektronenvervielfacher - treffen und registriert werden. Der „Dynolite Point Detector“ ist ein Sensor der den Ionenstrom nach dem ersten Teil des MS registriert und für Optimierung und Feinabstimmung genutzt wird.

Das MS wurde vor der ersten Messung durch einen externen Standard kalibriert. Dazu wurde ein Gemisch aus Natrium- und Cäsium-Iodid (Waters) verwendet, dessen genaue m/z -Werte als Kalibrierungskurve hinterlegt sind. Die Kalibrierung erfolgte für den Massenbereich zwischen 80 und 2750 m/z . Zum Ende der Messungen wurde die Kalibrierung durch einen

weiteren Standard aus 5 pmol/ μ L Myoglobin aus dem Herzmuskel des Pferdes (Sigma) und 10 pmol/ μ L Trypsinogen vom Rind (Sigma) noch einmal überprüft.

Proben, die direkt aus einer Umkehrphasen-HPLC kamen, wurden im Vakuumkonzentrator eingetrocknet und danach in 100 μ L Laufmittel (50 % Acetonitril (v/v)/ 0,2 % Ameisensäure (v/v)) aufgenommen. Proben, die noch mit Salzen vermischt waren, wurden zuerst per Zip-Tip (Millipore) nach den Angaben des Herstellers oder einer Mischung aus Poros P2 & Oligo P3 (Applied Biosystems) nach dem folgenden Protokoll gereinigt: Eine Gel-Ladespitze wurde mit einer Zange an der Spitze stark verengt und mit 5 μ L der Poros-Suspension (100 mg Poros 50 R2, 50 mg Oligo 30 R3 in 700 μ L 70 % Acetonitril) befüllt und die Flüssigkeit durch Zentrifugation entfernt. Die Äquilibration dieser Mini-Säule erfolgte durch zweimal 40 μ L der Befeuchtungslösung (100 % Acetonitril), gefolgt von zweimal 40 μ L der Äquilibrationlösung (0,1 % Trifluoressigsäure in TKA-H₂O). Dazu wurden die Proben im Vakuumkonzentrator eingetrocknet, in der Äquilibrationlösung gelöst und auf die Säule gegeben. Das Waschen der Proben erfolgte fünfmal mit 20 μ L der Äquilibrationlösung und einmal mit 20 μ L Waschlösung (5 % Methanol, 0,1 % Trifluoressigsäure in TKA-H₂O). Die Elution wurde in aufsteigender Konzentration des organischen Lösungsmittels mit 10 μ L 0,2 % Ameisensäure + 30 % Methanol, 10 μ L 0,2 % Ameisensäure + 50 % Methanol, 10 μ L 0,2 % Ameisensäure, 70 % Methanol und 10 μ L 5 % Ameisensäure + 95 % Acetonitril durchgeführt.

Die massenspektrometrische Messung erfolgte je nach Signalintensität über 25 bis 100 Messintervalle, wobei ein Messintervall aus einer Sekunde Messzeit und einer zehntel Sekunde Pause bestand. Die in dem Laufmittel aufgenommene Probe wurde mit einer Geschwindigkeit von 20 μ L/ min in das MS eingespritzt. Die Konustemperatur betrug dabei 100°C und die Desolvatisierungstemperatur 150°C. Die Kapillarspannung lag zwischen 2,75 und 3,25 kV und die Konusspannung zwischen 35 und 65 V. Als Trägergas wurde trockener Stickstoff verwendet. Sobald ein stabiles Signal anhand des Chromatogramms zu erkennen war, wurde die Datenaufnahme für 25 bis 100 Messintervalle gestartet.

Für die Auswertung wurde aus den m/z-Werten, die mehrfach geladene Spezies unterschiedlicher Moleküle darstellen, die Masse der einfach geladenen Moleküle errechnet. Dazu wurden die Einzelspektren zu einem Spektrum aufaddiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Dekonvolutions-Algorithmus ein Spektrum errechnet, das die einfach geladenen Spezies darstellte. Dabei kamen der MaxEnt1- und der MaxEnt3-Algorithmus der MassLynx Software

(Micromass/ Waters) zur Anwendung. Der MaxEnt1 Algorithmus benutzt die Methode der maximalen Entropie und ist für die Berechnung des Massenspektrums oberhalb des Messbereichs geeignet. Der MaxEnt3 Algorithmus wertet das Isotopenmuster der mehrfach geladenen Spezies aus und berechnet die monoisotopische Masse. Der MaxEnt3 Algorithmus ist für den niedermolekularen Bereich < 10 kDa geeignet.

4.8 Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie

Mit der CD-Spektroskopie wird die unterschiedliche Absorption optisch aktiver Substanzen mit polarisiertem Licht gemessen. Diese Methode kann zur Konformationsanalyse von Peptiden und Proteinen verwendet werden. Dabei zeigen eine rechtshändige alpha-Helix, ein antiparalleles beta-Faltblatt und ungeordnete Strukturen verschiedene Absorptionseigenschaften. Die Auswertung des CD-Spektrums erfolgt im Vergleich mit Standardproteinen bekannter Konformation. Die Hornerin-Proteine sollten mit der CD-Spektroskopie auf Sekundärstrukturelemente untersucht werden. Die CD-Spektroskopie wurde freundlicher Weise mit Unterstützung von Dr. rer. nat. Sascha Jung und M. Sc. Tim Kerkow aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Joachim Grötzinger, Biochemisches Institut, CAU Kiel an dem in seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden CD-Spektrometer J-720 Spectropolarimeter von JASCO durchgeführt.

4.9 Immunologische Methoden

4.9.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgte in der Ziege. Dazu wurden vom Trichohyalin-like1 zwei verschiedene Abschnitte des Proteins rekombinant hergestellt (Fragment 1: Aminosäure 14 bis 248 und Fragment 2: Aminosäure 369-784). Die Fragmente wurden als RP-HPLC-gereinigte Proteine ohne Fusionsteil verwendet. Die eine Hälfte des verwendeten Proteins wurde an Hämocyanin der Schlüssellochschnecke „Keyhole Limpet Hemocyanin“ KLH gekoppelt, um die Immunantwort und somit die Antikörperproduktion in der Ziege zu erhöhen, die andere Hälfte wurde ohne weitere Modifikation verwendet. Es wurde eine 2 µg/µL-Lösung der Proteine in PBS hergestellt. Um das KLH für die Kopplung an das Protein vorzubereiten, wurde 1 mg KLH mit 1 µL 25 % Glutaraldehyd und 900 µL PBS vermischt und 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Das ungebundene Glutaraldehyd wurde über eine 30 kDa-Größenfiltrationssäule (Amicon Ultra-0,5, Millipore) nach Anleitungen des Herstellers abgetrennt. Das KLH-Glutaraldehyd-Konjugat wurde mehrmals mit PBS gewaschen

und mit PBS auf ein Endvolumen von 400 μL eingestellt. Von den jeweils 2 mg der Trichohyalin-like1-Fragmente wurden jeweils 1 mg zur Kopplung mit dem KLH-Glutaraldehyd versetzt und in einem Gesamtvolumen von 1 mL bei Raumtemperatur 1 h schüttelnd inkubiert. Zur Beendigung des Kopplungsvorgangs wurde Tris-HCl pH 8,0 in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Das an KLH gekoppelte Protein wurde mit dem ungekoppelten Protein anschließend vereinigt. Das Gemisch der gekoppelten und ungekoppelten Proteine soll die Zahl der potenziellen Antigene aufgrund eventueller Konformationsunterschiede zwischen gekoppeltem und ungekoppeltem Protein steigern und so eine erhöhte Zahl an Epitopen bereitstellen. Für die Grundimmunisierung wurden 650 μg und für die drei Folgeimmunisierungen je 450 μg des TCHHL1 Proteingemisches aliquotiert. Die Immunisierung wurde vom ZIKA-Kaninchenbetrieb Goymann in Gottin durchgeführt. Nach der Grundimmunisierung erfolgten die Folgeimmunisierungen im dreiwöchigen Abstand; Serum wurde vier Wochen nach der letzten Immunisierung entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte wie unter dem Abschnitt Chromatographie beschrieben (Abschnitt 4.6.1).

4.9.2 Immuno-Dot-Blot-Analyse

Für Immuno-Dot-Blot Analysen von Proben mit einer Konzentration $> 250 \text{ ng}/\mu\text{L}$ wurden 1 bis 2 μL auf eine Nitrocellulosemembran (NC, Porendurchmesser 0,2 μm , GE Healthcare) pipettiert und getrocknet. Für Proben mit einer Konzentration $< 250 \text{ ng}/\mu\text{L}$, wurde eine Immuno-Dot-Blot-Apparatur verwendet, bei der eine Nitrocellulosemembran zwischen zwei mit Bohrungen versehene Kunststoffblöcke gelegt wird. In die obere Bohrung wird die Probe eingefüllt und an die untere Bohrung wird ein Vakuum angelegt, so dass die Flüssigkeit durch die Membran gesaugt wird und die Proteine an die Membran binden. Die Membran wurde mit einer 5 %igen Lösung aus Rinderserumalbumin (BSA) in PBS-T (PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20) und 0,02 % Natriumazid für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden ersten Antikörper verdünnt in PBS-T und 0,02 % Natriumazid für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde für 5 min, 10 min und 20 min mit PBS-T schüttelnd gewaschen und mit dem an Meerrettichperoxidase „Horseradish Peroxidase“ (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper 1:20000 in PBS-T verdünnt

für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Abschließend wurde sechsmal mit PBS-T über 5 min schüttelnd gewaschen und es erfolgte die Detektion mit Roche LumiLight plus Peroxidase-Substrat nach den Angaben des Herstellers. Die Dokumentation erfolgte mit dem „Diana III Digital CCD Imaging System“ oder der „FUSION FX7“.

4.9.3 Western-Blot-Analyse

Das Vorgehen bei der Western-Blot-Analyse ist mit dem bei der Immuno-Dot-Blot-Analyse (Abschnitt 4.9.2) nahezu identisch. Hier werden allerdings im ersten Schritt die Proteine, die zuvor in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden, in einem elektrischen Feld von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran oder Polyvinylidenfluorid (PVDF, Porendurchmesser 0,2 µm, GE Healthcare) transferiert. Dazu ist es erforderlich, dass die Proteine geladen sind und als Anionen vorliegen. Um dieses zu gewährleisten, wird ein alkalischer Transferpuffer mit geringen Mengen an SDS versetzt. Der Transferpuffer bestand aus 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % (w/v) SDS und 20 % EtOH (pH 9,2). Nach dem Transfer ist das weitere Vorgehen mit dem bei der Immuno-Dot-Blot-Analyse beschriebenen identisch.

4.9.4 Immunhistochemie

Für die immunhistologische Analyse wurden in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus dem Archiv der Hautklinik Kiel verwendet. Am Mikrotom wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 µm hergestellt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden zweimal 10 min mit Xylolersatz und absteigender Konzentrationen von Ethanol entparaffiniert, anschließend rehydriert und durch eine zwanzigminütige Inkubation in 10 mM Citratpuffer mit EDTA bei 80°C demaskiert. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde abgekühlt und mit TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween) für fünf Minuten gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte durch Inkubation mit 12 % BSA und Roti®-ImmunoBlock (1:10) in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl) für 10 min. Die Schnitte wurden in TBS gewaschen und für 16 h bei 4°C mit affinitätsgereinigtem polyklonalem Ziege-α-human-Trichohyalin-like1-Antikörpern (1,25 µg/mL in TBS + 1 % (w/v) BSA) oder Maus-α-human-Trichohyalin monoklonalen Antikörper AE15 (2,5 µg/ml in TBS + 1 % (w/v) BSA) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Schnitte wurden mit TBS gespült und für 30 min mit biotinyliertem Kaninchen-α-Ziege-Antikörper (1:500 verdünnt in TBS + 1 % BSA) bzw. Schaf-α-Maus-Antikörper (1:500 verdünnt in TBS + 1 % BSA) inkubiert. Nach wiederholtem Spülen mit TBS wurde die Detektion des sekundären Antikörpers mittels des Vectastain ABC-AP®-Systems

(Vector) nach Angaben des Herstellers für 30 min durchgeführt. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wurde das Vector Red Alkaline Phosphatase-Substrate-Kit (Vector) eingesetzt. Für die Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet. Die Spezifität der Trichohyalin-like1-Antikörper wurde durch Blockierung mit dem Antigen getestet. Als Negativ-Kontrolle dienten Schnitte, die statt mit spezifischem Primärantikörper mit Präimmunserum inkubiert worden waren, sowie Schnitte ohne die Zugabe von Primärantikörper. Die Analyse der Schnitte wurde an einem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss) durchgeführt.

4.10 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Um die Morphologie von Hornerin-behandelt Bakterien im Vergleich mit unbehandelten Bakterien zu untersuchen, wurden transmissionselektronische Aufnahmen erstellt. Dabei lag das Interesse besonders auf den möglichen Zielstrukturen für das Hornerin in den Bakterien. Für die TEM wurden die zu untersuchenden Mikroorganismen aus einer geschüttelten Übernachtskultur in 25 mL TSB- oder BHI-Medium mit einer OD_{600} von 0,02 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Bei einer OD_{600} von 0,2 bis 0,4 wurden die Zellen bei 6000 x g für 5 min und Raumtemperatur zentrifugiert, das Pellet in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2-7,4 + 1 % TSB bzw. 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,5 + 0,25 % Glukose (13,88 mM) gewaschen, in einem Volumen des entsprechenden Puffers resuspendiert und die OD_{600} auf ca. 2,0 eingestellt. Die in der antimikrobiellen Testung verwendete Anzahl der Bakterien lag zwischen 10^4 und 10^5 Bakterien pro mL. Eine OD_{600} von 2,0 entspricht einer Anzahl - je nach Bakterium - von circa 10^9 - 10^{10} Bakterien pro mL. Somit ist für die Behandlung der Bakterien für die elektronenmikroskopische Analyse eine sehr viel höhere Konzentration des jeweiligen Proteins oder Peptides notwendig. Entscheidend ist die Anzahl von Molekülen pro Bakterium und nicht die Anzahl der Moleküle pro Volumen. Deshalb wurden zu 150 µL der Bakteriensuspension eine aus der Bakterienzahl errechnete Menge der verschiedenen Proteine und Peptide gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 16,5 µL 25 % Glutaraldehyd zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die so fixierten Bakterien wurden am nächsten Tag bei 3220 x g für 10 min bei Raumtemperatur im Ausschwingrotor pelletiert und in 30 µL 2 % Noble Agar resuspendiert. Für die Schnittpräparation wurde der Block mehrfach mit PBS gewaschen, mit 1 % Osmiumtetroxid kontrastiert, mehrfach mit PBS gewaschen, in einer aufsteigender Ethanolreihe entwässert, in Acrylharz LR White eingebettet und bei 60°C polymerisiert.

Die Präparation (d. h. Entwässern, Einbetten, Schneiden und Kontrastieren) erfolgten durch die zentrale Mikroskopie im Biologiezentrum der CAU Kiel. Das Erstellen der transmissionselektronischen Aufnahmen erfolgte in meiner Gegenwart in der zentralen Mikroskopie.

5 Ergebnisse

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten aus Extrakten von Hornhautschuppen der Ferse diverse Proteine isoliert werden, die zum Teil antimikrobielle Eigenschaften aufwiesen. Die Bestimmung der Amino-terminalen Aminosäuresequenz eines dieser Proteine lieferte den Hinweis auf ein zum Zeitpunkt der Entdeckung unbekanntes Protein der „S100 Fused Type“-Protein-Familie (SFTPs). In der Dissertation von Zhihong Wu (Wu, 2005) wurde der Bereich auf Chromosom 1q21.3, in dem die SFTPs kodiert sind, genauer untersucht. Dieser Abschnitt liegt innerhalb des „Epidermalen Differenzierungskomplexes (EDC)“ und kodiert für sieben verschiedene Proteine. Neu beschrieben wurden neben Hornerin (HRNR), das parallel von Takaishi *et al.* (Takaishi et al., 2005) untersucht wurde, auch Filaggrin-2 (FLG2) (auch Ifapsoriasin genannt), welches genauer in der Dissertation von Britta Hansmann (Hansmann, 2009) analysiert wurde, Cornulin (CRNN) und Repetin (RPTN), die von der Gruppe von Daniel Hohl (Contzler et al., 2005; Huber et al., 2005) bearbeitet wurden sowie Trichohyalin-like1 (TCHHL1). Die beiden anderen Proteine dieser Gruppe (Filaggrin (FLG) und Trichohyalin (TCHH)) sind schon seit längerem bekannt und eingehend untersucht worden.

5.1 Die genetische Lokalisation und Struktur von TCHHL1 und HRNR

Alle SFTPs werden auf dem reversen DNA-Strang in der Bande 21.3 auf dem langen Arm des Chromosom 1 kodiert. Die Abb. 12 zeigt ein Schema des Chromosom 1, in dem eine Region der Bande 1q21.3 im Bereich von 152,05 bis 152,39 Mb vergrößert dargestellt ist.

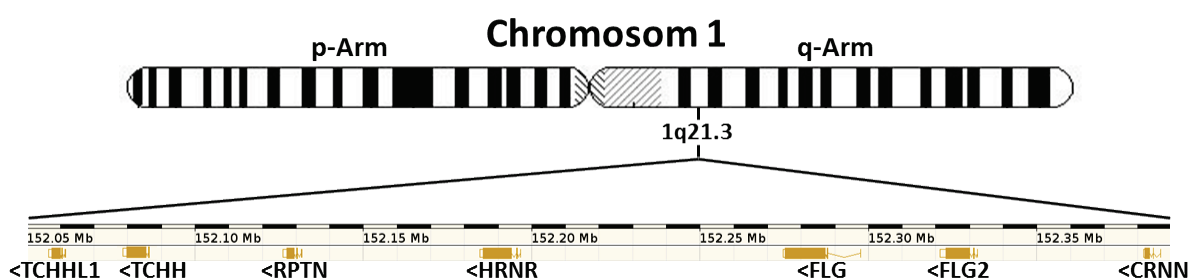


Abb. 12: Chromosomale Lokalisation von TCHHL1 und HRNR auf dem reversen DNA-Strang im Bereich zwischen 152,05 bis 152,39 Mb (Chromosom 1q21.3). Jeder Abschnitt der schwarz-weißen Skala entspricht 10000 bp. Die Pfeile vor der Bezeichnung des Gens zeigen die Transkriptionsrichtung auf dem reversen Strang an. Dargestellt werden die Gene im verhältnismäßigen Abstand zueinander. Die Abkürzungen der Gene entsprechen den folgenden Proteinen: TCHHL1 – Trichohyalin-like1; TCHH – Trichohyalin; RPTN – Repetin; HRNR – Hornerin; FLG – Filaggrin; FLG2 – Filaggrin2; CRNN – Cornulin. Die Abbildung ist adaptiert aus der Darstellung der DNA in dem angegebenen Bereich aus www.ensembl.org (vom 18.03.2011) (Flicek et al., 2011).

Es werden sowohl alle kodierenden als auch alle nicht kodierenden Bereiche sowohl innerhalb der Gene als auch zwischen den Genen gezeigt, um die genetische Struktur zu verdeutlichen.

In Abb. 13 ist die genetische Struktur aller sieben SFTPs dargestellt; dabei fällt die ausgeprägte Ähnlichkeit in der Anordnung der Introns und Exons auf. Bis auf das Trichohyalin bestehen alle Gene aus drei Exons und zwei Introns. Der erste kodierende Bereich in Exon 2 ist in allen Genen 138 bp lang; die davor liegenden, beiden nicht kodierenden Bereiche auf Exon 1 und Exon 2 sind zwischen 15 und 51 bzw. zwischen 13 und 25 bp lang. Der kodierende Bereich im Exon 3 (bzw. Exon 2 beim TCHH) ist bei allen Genen unterschiedlich groß.

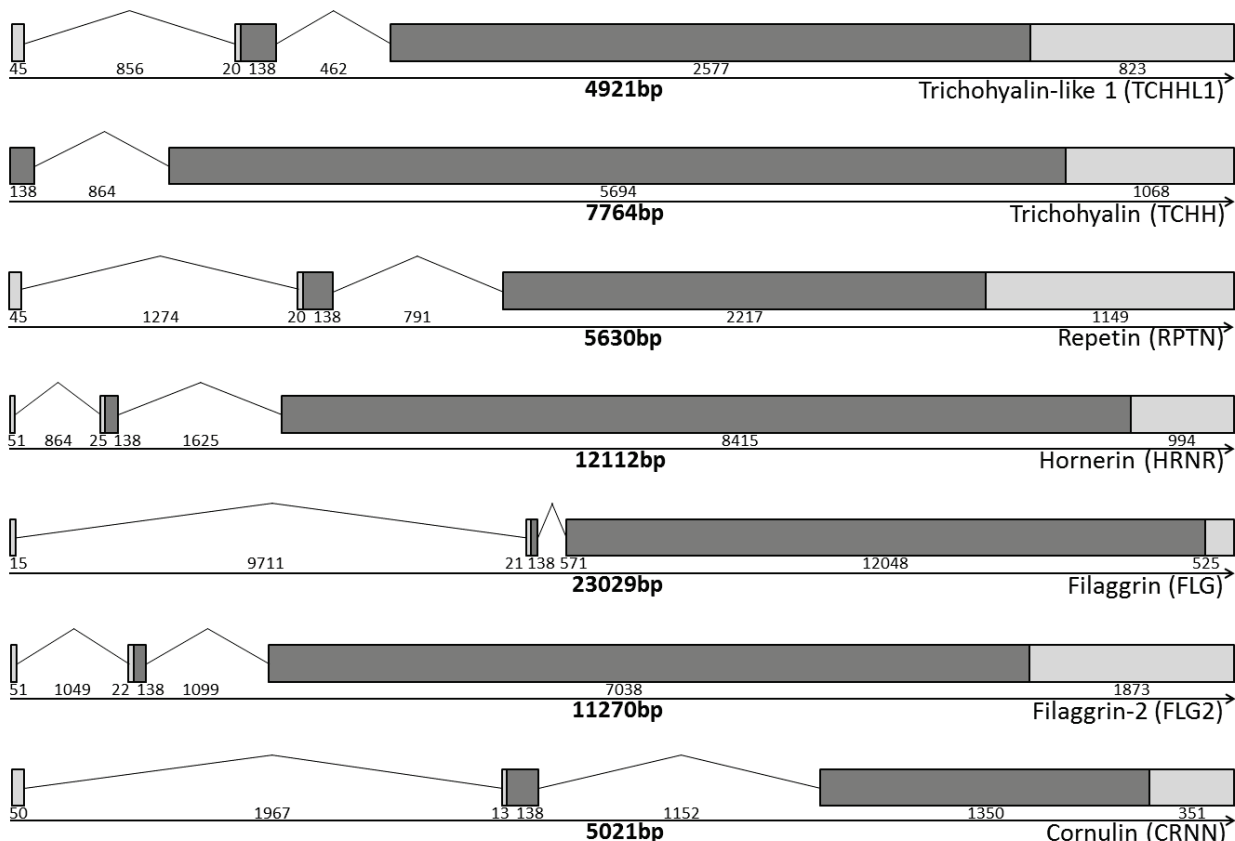


Abb. 13: Darstellung der genetischen Struktur aller sieben bekannten SFTPs. In der Abbildung sind die Introns durch Striche symbolisiert. Die kodierenden Bereiche der Exons sind dunkelgrau und die nicht kodierenden Bereiche hellgrau dargestellt. Unterhalb jeder Einzeldarstellung sind die Anzahl der Basenpaare, die durch den jeweiligen Kasten bzw. Linie repräsentiert werden, angegeben. Die Gesamtlänge des jeweiligen Gens ist zusammen mit der Bezeichnung des Proteins und des Gens unterhalb des Pfeils angegeben. Die Daten sind www.ensembl.org (vom 18.03.2011) entnommen.

Die Proteinbiosynthese, also die Transkription von DNA in mRNA und Translation von mRNA zum Protein, ist in Abb. 14 für das TCHHL1- und HRNR-Gen dargestellt. Diese beiden Gene bestehen aus 2 Introns und 3 Exons, die im Fall des TCHHL1 eine gespleißte mRNA von 3603 Basen ergeben, von denen 2715 Basen für ein 904 Aminosäuren langes Protein kodieren. Für HRNR ergibt sich eine aus 9623 Basen bestehende gespleißte mRNA, bei der 8553 Basen für ein 2850 Aminosäuren langes Protein kodieren. Die Gesamtsequenz beider Proteine befindet sich in Abb. 51 und Abb. 52 im Anhang.

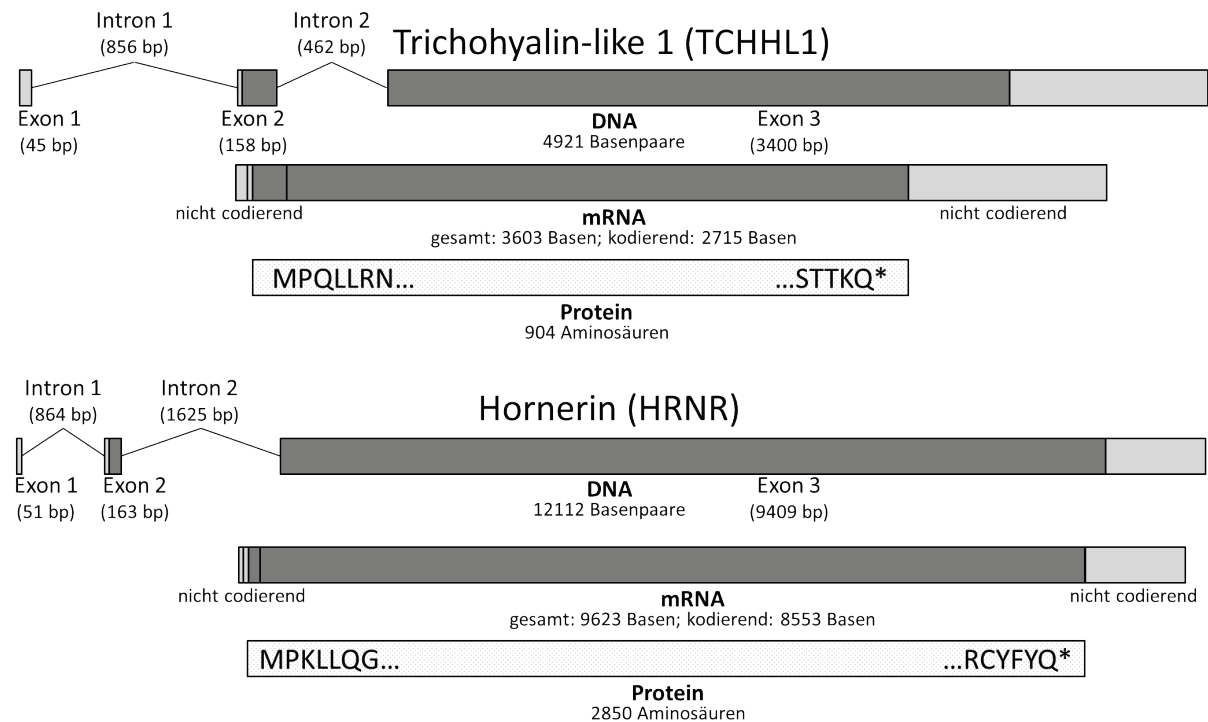


Abb. 14: Struktur des TCHHL1- und des HRNR-Gens auf genomischer und mRNA-Ebene sowie die abgeleitete Proteinsequenz. Die Darstellung der Exons sowie die kodierenden und nicht-kodierenden Bereiche der Introns sind identisch zur Abb. 12.

5.2 Bioinformatische Proteinanalyse von TCHHL1 und HRNR

Bei Nutzung zahlreicher für die Vorhersage von Strukturelementen zur Verfügung stehender Software und Datenbanken konnten außer einer S100-Calcium-Bindungs-Domäne und einer „EF-hand-like“-Domäne keine weiteren bekannten Domänen in der TCHHL1- oder der HRNR-Sequenz detektiert werden. Aus den Sequenzen lassen sich keine Hinweise auf die 2D-Struktur der Proteine ableiten. Die „EF-hand-like“-Domäne von TCHHL1 wurde mit den „EF-hand-like“-Domänen der anderen sechs SFTPs verglichen. TCHHL1 zeigt im Vergleich mit den anderen SFTPs die größten Veränderungen. In Abb. 15 ist der Vergleich der S100 „EF-hand-like“-Domänen der SFTPs dargestellt.

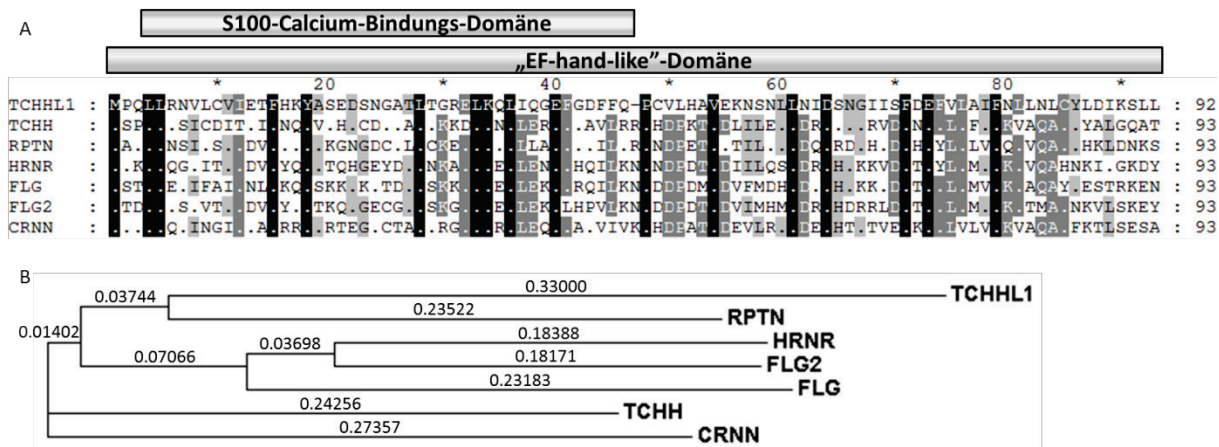


Abb. 15: Vergleich der S100-Calcium-Bindungs-Domäne/ „EF-hand-like“-Domäne aller sieben SFTPs. A) Bei diesem Vergleich wurden die ersten 92 bzw. 93 Aminosäuren der „S100 fused type“-Proteine dargestellt. Die unterschiedlichen Schattierungen der Aminosäuren entsprechen dem prozentualen Anteil an Identität (schwarz entspricht 100 % Identität; dunkelgrau entspricht 75 % bis 99 % Identität; hellgrau entspricht 50 % bis 74 % Identität und weiß entspricht weniger als 50 % Identität). Deutlich zu erkennen ist, dass TCHHL1 die größten Veränderungen im Vergleich mit den anderen Proteinen aufweist. Das Alignment wurde mit dem M-coffee Algorithmus (Moretti et al., 2007) erzeugt und mit dem Programm GeneDoc für die Darstellung optimiert. Oberhalb der Sequenzen sind die Positionen der S100 calcium binding domain (aus der Pfam 24.0 Datenbank (Finn et al., 2010)) und die „EF-hand-like“-Domäne (aus der Superfamily 1.75 Datenbank (Gough et al., 2001)) gekennzeichnet. Die Suche nach den Proteindomänen, Proteinfamilien und funktionellen Einheiten erfolgte über die InterPro Datenbank (Hunter et al., 2009). **B)** Hierbei handelt es sich um ein Phylogramm, bei dem die Distanzen zwischen den einzelnen Proteinsequenzen der „EF-hand-like“-Domäne ein Maß für die Identität darstellen. Dieses Phylogramm wurde mit Hilfe des ClustalW2 Algorithmus erzeugt.

Von den anderen sechs SFTPs ist bekannt, dass sich mehrere repetitive Sequenzen an die „EF-hand-like“-Domäne und einen „Spacer“ anschließen (Lee et al., 1993; Lonsdale-Eccles et al., 1984; Wu, 2005; Xu et al., 2000). Die repetitiven Einheiten in den verschiedenen Proteinen zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit. Mit Hilfe verschiedener Programme wurde versucht, auch im TCHHL1 diese repetitiven Sequenzen zu detektieren. Mit dem Programm RADAR (Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats in protein sequences) (Heger und Holm, 2000) wurde TCHHL1 mit den anderen sechs SFTPs hinsichtlich der zu detektierenden repetitiven Einheiten verglichen. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in der Abb. 16 dargestellt. Mit dem TRUST Algorithmus (Szklarczyk und Heringa, 2004) konnten im TCHHL1 insgesamt vier repetitive Einheiten detektiert werden (Aminosäuren 265-306, 307-352, 353-396 und 397-423). Mit den Algorithmen REPPER (Gruber et al., 2005), HHrep (Soding et al., 2006), XSTREAM (Newman und Cooper, 2007) und HHrepID (Biegert und Soding, 2008) konnten keine repetitive Einheiten gefunden werden.

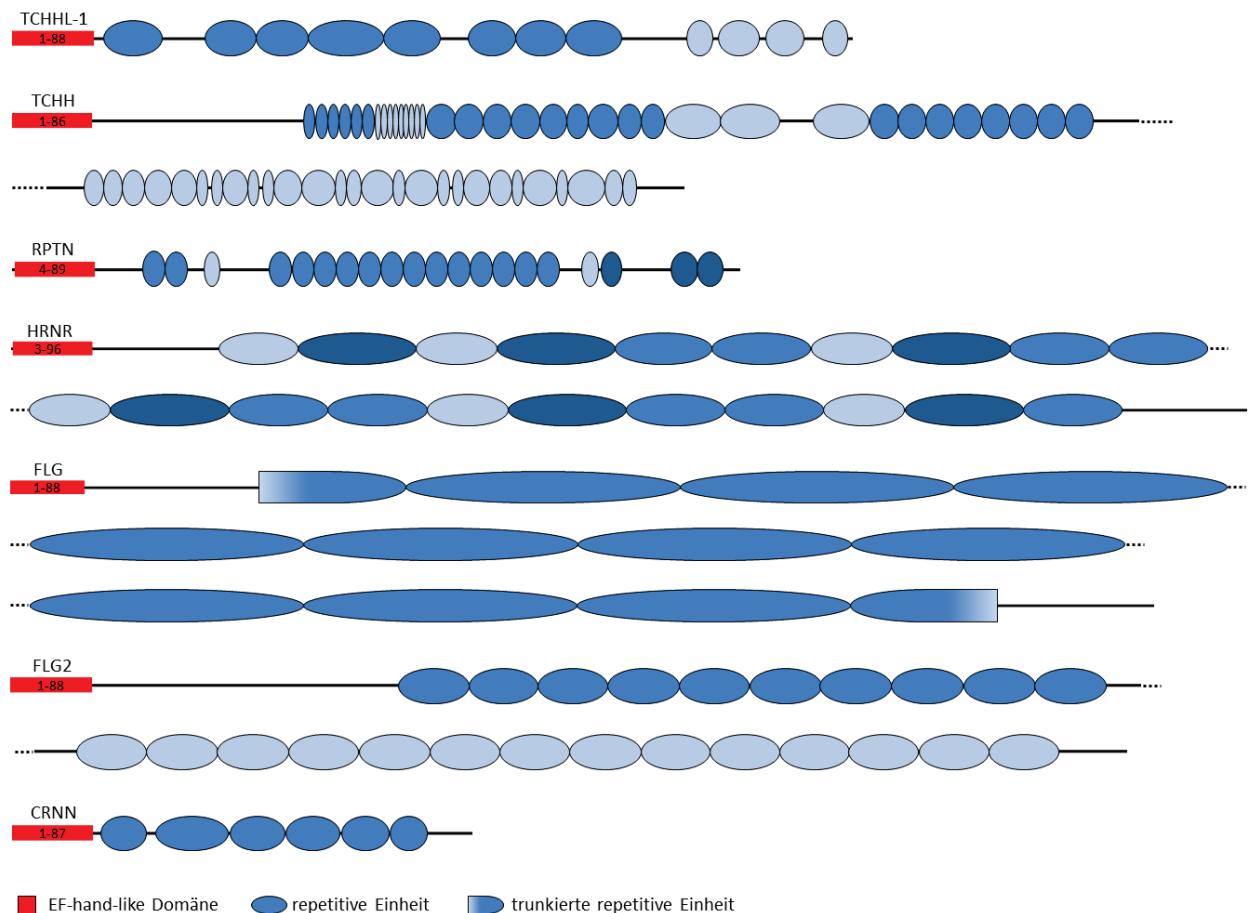


Abb. 16: Darstellung der repetitiven Einheiten aller 7 SFTPs im Vergleich. Die Länge aller Proteine ist proportional zueinander dargestellt. Die Sequenz von TCHH, HRNR, FLG und FLG2 ist aufgrund der Länge in zwei bzw. drei Abschnitte unterteilt. Die Trennung wird durch eine gepunktete Linie symbolisiert. Die „EF-hand-like“-Domäne wird durch einen roten Kasten symbolisiert indem die erste und letzte Aminosäure bezeichnet sind. Die repetitiven Einheiten werden durch Ovale dargestellt. Dabei sind ähnliche Einheiten durch die gleiche Farbe gekennzeichnet. Die repetitiven Einheiten wurden mit dem Programm RADAR detektiert und mit den Daten aus verschiedenen Veröffentlichungen abgeglichen (TCHH (Lee et al., 1993), HRNR (Wu, 2005), FLG (Gan et al., 1990), FLG2 (Wu et al., 2009a)).

Da außer der „EF-hand-like“-Domäne keine weiteren Domänen detektiert werden konnten und auch im Vergleich zu den anderen SFTPs nur gering konservierte repetitive Sequenzen gefunden wurden, stellte sich die Frage welche Struktur TCHHL1 einnimmt. Eine Überprüfung der Aminosäurezusammensetzung des Proteins zeigte einen überdurchschnittlich großen Anteil an polaren Aminosäuren und nur wenige hydrophobe Aminosäuren (Abb. 17). Diese Zusammensetzung ist charakteristisch für sogenannte „intrinsically disordered proteins, IDPs“ (Uversky et al., 2000). Die IDPs sind eine Gruppe von Proteinen, bei denen keine bekannten Sekundärstrukturen detektiert werden können.

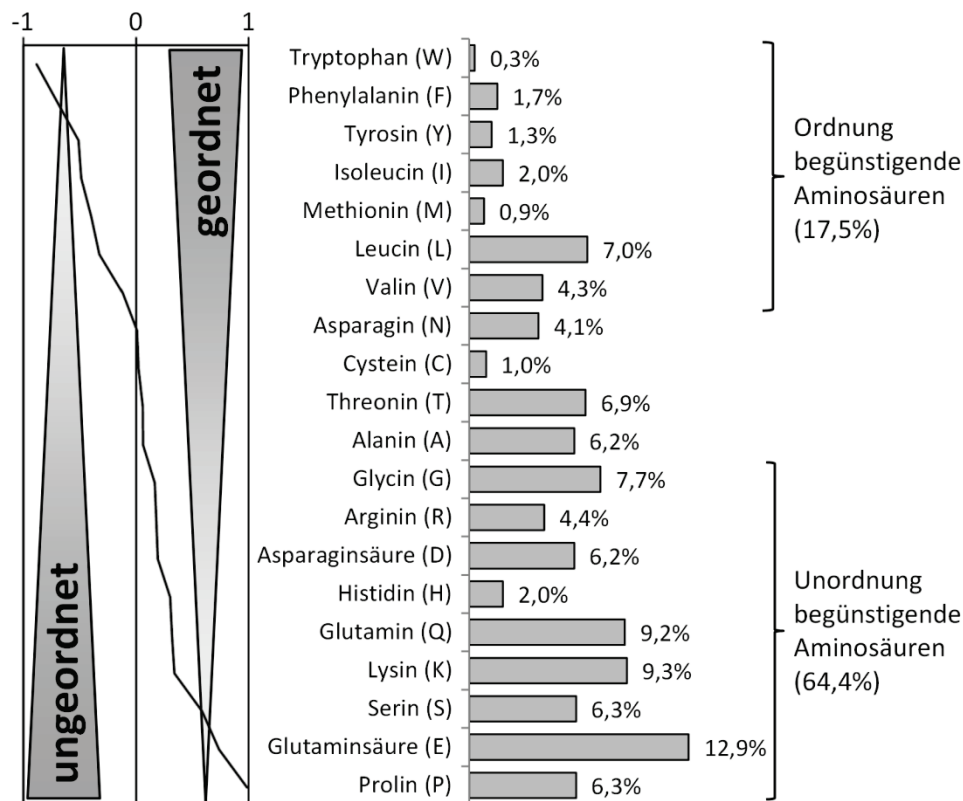


Abb. 17: Aminosäurezusammensetzung des TCHHL1. Die Aminosäuren sind so angeordnet, dass oben die eine geordnete Struktur begünstigen und unten die „intrinsically disordered protein, IDP“-begünstigende Aminosäuren aufgelistet sind. Den Einfluss der jeweiligen Aminosäure auf die Struktur entspricht der TOP-IDP-Skala bei der jeder Aminosäure ein Wert zwischen -1 und 1 zugeordnet wird. Dieser Wert ist in dem Graphen auf der linken Seite für jede Aminosäure dargestellt. Dabei entspricht der Wert -1 einer Aminosäure, die eine geordnete Struktur bedingt und der Wert 1 einer Aminosäure, die eine ungeordnete Struktur unterstützt (Campen et al., 2008). Der Anteil der Aminosäuren, die eine ungeordnete Struktur begünstigen, beträgt 64,4 %, der Anteil, der eine geordnete Struktur bedingt, beträgt dagegen 17,5%.

Für die bioinformatische Analyse dieser Proteine stehen ca. 50 verschiedenen Programme zur Verfügung (Tompa, 2012b), die nur anhand der Aminosäuresequenz eine Vorhersage für die Wahrscheinlichkeit einer solchen Unordnung errechnen. Dabei werden ab initio-, clustering- oder meta-Methoden unterschieden (Deng et al., 2012). Es wurde eine Analyse mit allen sieben SFTPs und den beiden Proteinen Loricrin und Involucrin durchgeführt. Loricrin und Involucrin kommen beide im „cornified envelope“ vor und zeigen einen ähnlichen molekularen Aufbau wie die SFTPs. Die Analyse erfolgte mit den Programmen Consensus Disorder Prediction (CDP) einem meta-Programm aus DisEMBL (Linding et al., 2003a), GLOBPLOT 2 (Linding et al., 2003b) und DISOPRED (Ward et al., 2004), sowie den Programmen DisoClust (McGuffin, 2008), DISOPRED2 (Ward et al., 2004), FoldUnfold (Galzitskaya et al., 2006), POODLE-W (Shimizu et al., 2007), PreDisorder (Deng et al., 2009) und Protein Disorder prediction System (PrDOS) (Ishida und Kinoshita, 2007). Die Programme sind für die Erkennung von ungeordneten Bereichen innerhalb von Proteinsequenzen erstellt worden. Die Anzahl der Aminosäuren in den SFTPs liegt zwischen 495 im Cornulin und 4061 im Filaggrin.

Bei den folgenden Programmen ist die Länge der verwendeten Sequenz auf 1000 (DISOPRED2), 2000 (PreDisorder) und (PrDOS), bzw. auf 3000 (FoldUnfold) Aminosäuren begrenzt, so dass die längeren Sequenzen unterteilt werden mussten und nach der Analyse wieder zusammengefügt wurden. Für die anderen Programme gibt es keine Beschränkung in der Länge der verwendeten Sequenz. In Abb. 18 sind die Ergebnisse der Analysen mit PreDisorder und DISOPRED2 als ab initio-Methoden und DisoClust als clustering-Methode dargestellt. Die anderen Programme zeigten mit diesen vergleichbare Resultate. Auf der X-Achse ist hierbei die Position der Aminosäure und auf der Y-Achse ist eine relative Einheit der Unordnung dargestellt. Den Grenzwert der relativen Einheit, von dem an von einem „intrinsically disordered protein“ gesprochen wird, ist von dem verwendeten Programm abhängig und liegt im Bereich zwischen 0,05 und 0,5.

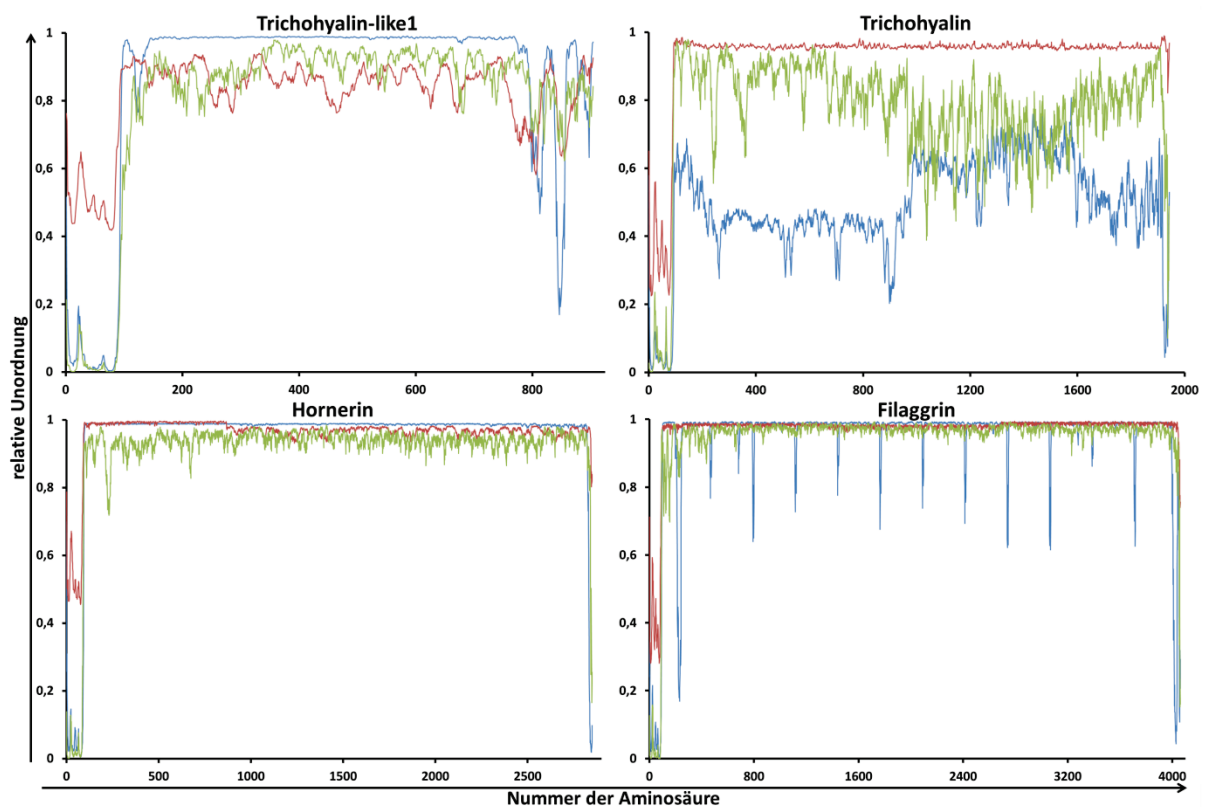


Abb. 18: Bioinformatische Analyse für „intrinsically disordered proteins“ mit TCHHL1, TCHH, HRNR und FLG. Auf der X-Achse ist die Position der Aminosäure und auf der Y-Achse eine relative Einheit für die Wahrscheinlichkeit der Unordnung dargestellt. In blau sind die Ergebnisse des Programms PreDisorder, in rot die des Programms DisoClust und in grün die des Programms DISOPRED2 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass die „EF-hand-like“-Domäne am Anfang der Proteine als ein geordneter Bereich detektiert wird, wohingegen die Bereiche der repetitiven Einheiten fast durchgehend als „intrinsically disordered regions“ erkannt werden.

5.2.1 Phylogenetischer Vergleich des TCHHL1

Ein phylogenetischer Vergleich des humanen TCHHL1 mit der Ensembl-Datenbank erbrachte die im Anhang in angegebenen Identitäten. Orthologe konnten nur innerhalb der Gruppe der Säugetiere festgestellt werden.

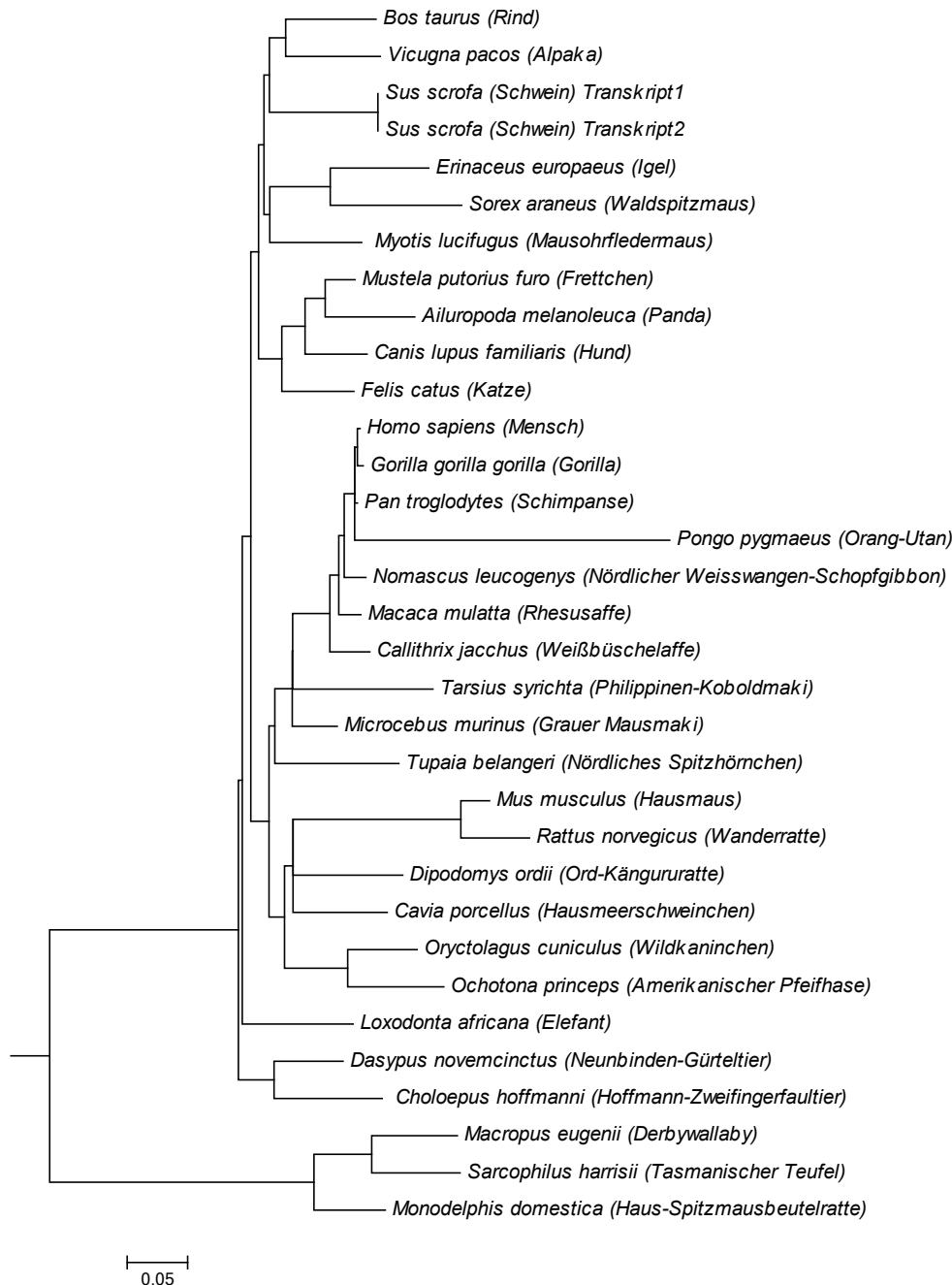


Abb. 19: Phylogenetischer Baum für die Orthologen des humanen TCHHL1. Der Vergleich ist in der Datenbank www.ensembl.org (vom 28.05.2013) durchgeführt worden. Dabei wurde die „Gene Orthology/Paralogy prediction method“ verwendet (Vilella et al., 2009). Diese arbeitet mit der Methode der größten Wahrscheinlichkeit. Der so generierte Stammbaum wurde exportiert und in der Software MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011) dargestellt und bearbeitet. Die Länge der Äste gibt als reziproken Wert den Grad der Identität an.

Zu einem geringen Prozentsatz (< 8 %) besteht auch eine Identität mit Genen aus unterschiedlichen Vögeln. Hier ist die Ähnlichkeit aber hauptsächlich auf die S100-Domäne

beschränkt, so dass aufgrund der hohen Identität zwischen den verschiedenen Genen der S100 Proteine keine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten S100 Protein möglich ist. Das Ergebnis des phylogenetischen Vergleichs ist in Form eines phylogenetischen Baumes in Abb. 19 dargestellt.

5.3 TCHHL1 ist in der inneren Haarwurzelscheide exprimiert

Für die Analyse der Expression von TCHHL1 wurden polyklonale Antiseren in der Ziege generiert (Abschnitt 4.9.1). Dafür wurden die beiden rekombinanten Proteine TCHHL1₁₄₋₂₄₈ und TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ verwendet (Abb. 51 im Anhang).

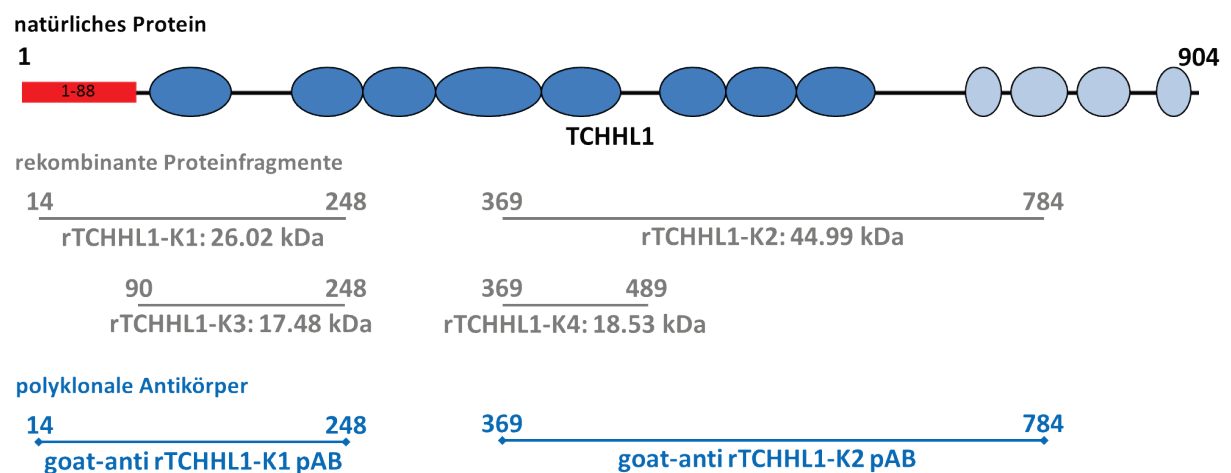


Abb. 20: Rekombinante TCHHL1-Proteinfragmente/ Epitope der polyklonalen Antikörper. Vom natürlichen TCHHL1-Protein wurden verschiedene Bereiche für die rekombinante Expression ausgewählt. Die rekombinanten Proteinfragmente K1 und K2 wurden für die Immunisierung von zwei Ziegen verwendet.

Für die ersten Untersuchungen wurden die polyklonalen Antikörper (pAK) mittels Affinitätschromatographie gegen das für die Immunisierung verwendete rekombinante Protein aufgereinigt. Mit den so gereinigten Antikörpern zeigte sich in den verschiedenen Lokalisationen der Haut (Bauch, Bein, Brust, Gesicht, Hals, Kopf, Oberarm, Oberschenkel, Ohr, Rücken, Schläfen, Stirn, Unterarm, Wange palmar und plantar) sowie der Nasenschleimhaut eine ausgeprägte Färbung der Epidermis sowie der Schweiß- und Talgdrüsen und der Haare (Daten nicht gezeigt). Eine Überprüfung anderer epithelialer Gewebe (Gaumen, Harnröhre, Herz, Larynx, Lunge, Ohrspeicheldrüse, Pharynx, Speiseröhre, Zunge) zeigte keine Reaktivität (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Untersuchungen erfolgten eine affinitätschromatographische Aufreinigung der IgGs aus beiden Antiseren mit ProteinG, der Antigen-spezifischen IgGs mit dem für die Immunisierung verwendeten rekombinanten Proteinen und die Depletion der mit dem SUMO-„Tag“ kreuzreaktiven IgGs. Bei der Immunhistochemie zeigte sich für den Ziege- α -TCHHL1₁₄₋₂₄₈-pAK ein anderes Muster als für

den Ziege- α -TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-pAK. Aufgrund der in Abb. 15 dargestellten Ähnlichkeit der S100-Domäne der verschiedenen SFTP's konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer Kreuzreaktivität mit den S100-Domänen der anderen SFTP's kommt. Deshalb wurde ein weiteres rekombinantes Protein hergestellt bei dem die S100-Domäne depletiert wurde. Das TCHHL1₉₀₋₂₄₈ wurde wie oben beschrieben für die affinitätschromatographische Aufreinigung der IgGs verwendet. Mit dem Ziege- α -TCHHL1₉₀₋₂₄₈-pAK und dem Ziege- α -TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-pAK konnte in den Zellen der inneren Haarwurzelscheide Immunreaktivität nachgewiesen werden. Für Trichohyalin (TCHH) ist ein vergleichbares Expressionsmuster beschrieben (O'Guin et al., 1992). Deshalb stellte sich die Frage ob der Ziege- α -TCHHL1₉₀₋₂₄₈-pAK und der Ziege- α -TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-pAK auch TCHH erkennen. Der Vergleich mit TCHH wurde mit einem monoklonalen Maus- α -TCHH Antikörper (mAK) Klon AE15 (O'Guin et al., 1992) durchgeführt. Immunreaktives TCHH konnte dabei in den Zellen im basalen Bereich der inneren Haarwurzelscheide identifiziert werden (Abb. 21F), während immunreaktives TCHHL1 erst weiter distal detektiert werden konnte (Abb. 21E). Deutlich zu erkennen war eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb der Zellen. So färbte der TCHH-mAK eher granuläre Strukturen, während immunreaktives TCHHL1 in sehr intensiv wolkigen Bereichen nachgewiesen werden konnte (Abb. 21C und D). Eine Blockierung des TCHH-mAK mit dem TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-Antigen zeigte keine Verringerung der Reaktivität. Daraus kann geschlossen werden, dass der TCHH-mAK keine Kreuzreaktivität mit dem TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ zeigt. Die umgekehrte Blockierung konnte mangels des entsprechenden Antigens nicht durchgeführt werden.

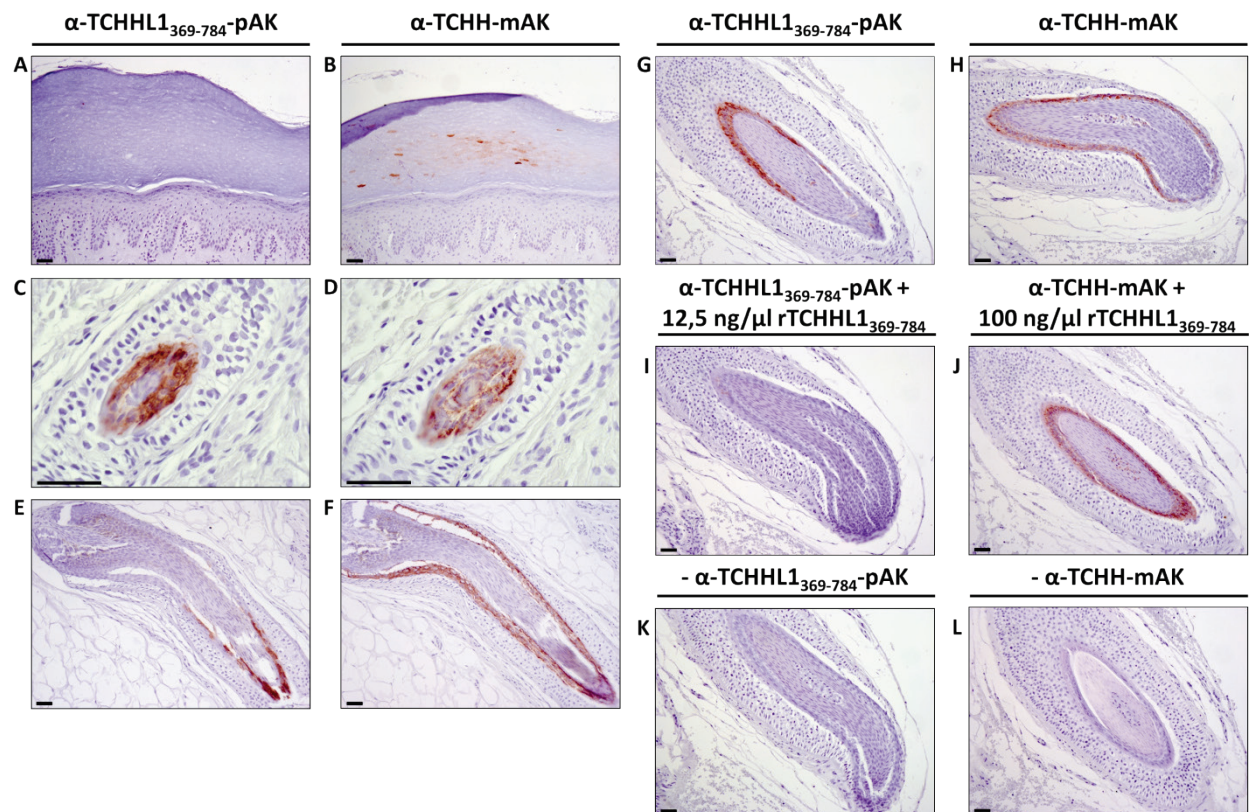


Abb. 21: Lokalisation von TCHHL1 und TCHH im Haarfollikel. A-F) Fortlaufende Schnitte gesunder Haut unterschiedlicher Lokalisationen (palmar: A + B; Kinn: C + D; und Kopfhaut: E + F) wurden mit dem Ziege- α -TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-pAK oder dem Maus- α -TCHH-mAK AE15 gefärbt. G-J) Blockierungsexperiment von α -TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-pAK und α -TCHH-mAK mit rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-Antigen. Färbung mit 1,25 ng/ μ L α -TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-pAK (G + I) und mit 2,5 ng/ μ L α -TCHH-mAK (H + J). Komplette Blockierung des α -rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-pAK mit 12,5 ng/ μ L rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ (I) und keine Blockierung des α -Trichohyalin-Antikörpers mit 100 ng/ μ L rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ (J). K+L) Kontrollexperimente ohne den ersten Antikörper. Die Abbildungen G bis L sind fortlaufende Schnitte von einem identischen Kinnhaar. Die Balken entsprechen 50 μ m (aus (Wu et al., 2011)).

5.4 TCHHL1 konnte in verschiedenen Extrakten nicht nachgewiesen werden

Für eine Analyse einer möglichen Prozessierung des TCHHL1 *in vivo* wurden aus verschiedenen Lokalisationen der Haut Proteinextrakte hergestellt. Dabei wurden aus Vollhaut, Epidermis, Haarwurzeln und Kallus, dabei handelt es sich um abgeschnittene Hornschwielen aus der medizinischen Fußpflege, mit 30 mM Tris pH 8,5 Puffer, denaturierend mit 7 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff, reduzierend mit 5 mM DTT und nicht-reduzierend unter Verwendung unterschiedlicher Detergenzien (1 % CTAB, 4 % CHAPS, 6 % SDS, 2 % n-Octyl- β -D-glucopyranoside, 1 % Triton X-100, 0,2 % Tween 20 oder 1 % NP-40) Proteine extrahiert.

Die so gewonnenen Extrakte wurden im Western-Blot mit α -TCHHL1₉₀₋₂₄₈-pAK und α -TCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-pAK auf das Vorhandensein von TCHHL1 analysiert. Bei keinem der Extrakte konnte ein Nachweis für das TCHHL1 erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Die Extraktion als solche war hingegen erfolgreich, da unterschiedliche Kontrollproteine (TCHH, HRNR, Keratin 5 und Keratin 14) in den Extrakten nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

5.5 TCHHL1 ist in stimulierten primären Keratinozyten nachweisbar

Für weitere Untersuchungen wurden primäre Keratinozyten mit 1 mM CaCl_2 über einen Zeitraum von 18 Tagen stimuliert. Die Überstände sowie ein Zelllysat vom Tag 18 der Stimulation wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse mit beiden Antikörpern ($\alpha\text{-TCHHL1}_{14-248}$ und $\alpha\text{-TCHHL1}_{369-784}$) unterzogen (Abb. 22).

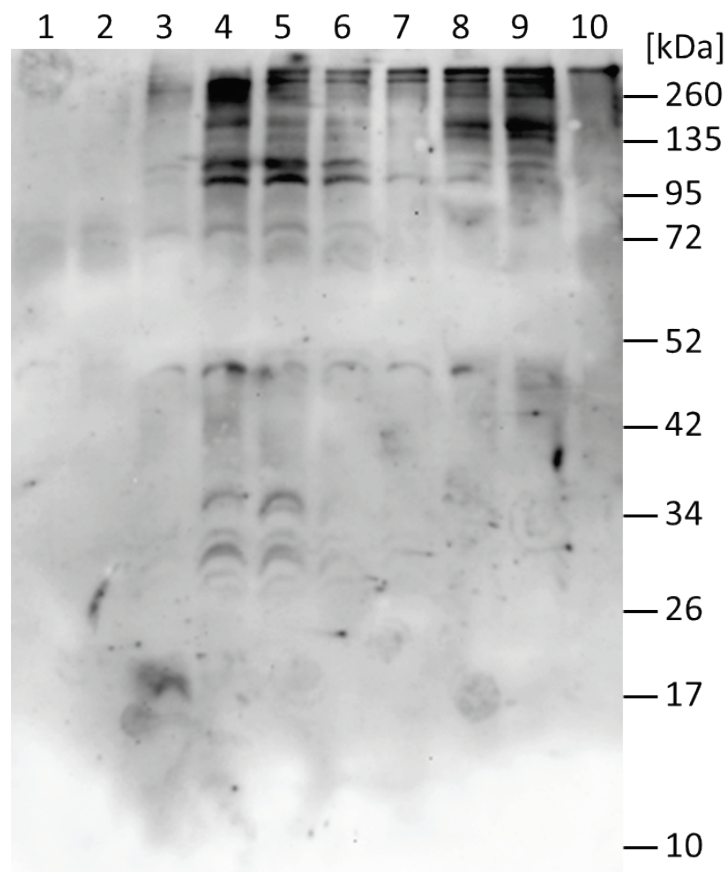


Abb. 22: TCHHL1-Western-Blot-Analyse von Keratinozytenüberständen und Lysat. Die Differenzierung primärer Keratinozyten wurde über 18 Tage mit 1 mM CaCl_2 stimuliert. Die Überstände wurden alle zwei Tage abgenommen. Am Tag 18 wurden die Keratinozyten in RIPA-Puffer resuspendiert und lysiert. In Spur 1 wurde der unstimulierte Überstand am Tag 0, in den Spuren 2-9 die stimulierten Überstände der Tage 2 bis 16 und in Spur 10 das Lysat der Keratinozyten vom Tag 18 aufgetragen. Gefärbt wurde mit einer Mischung aus den beiden Antikörpern Ziege- $\alpha\text{-TCHHL1}_{14-248}$ und Ziege- $\alpha\text{-TCHHL1}_{369-784}$. Die errechnete molekulare Masse des TCHHL1 beträgt 99,3 kDa. In den Keratinozytenüberständen wurde eine große Anzahl von Banden detektiert, während im Lysat nur eine hochmolekulare Bande nachgewiesen wurde. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt.

Deutlich war am Tag 6 nach Beginn der Stimulation das Auftreten von Banden im Bereich von 100 kDa bis weit über 260 kDa zu erkennen. Die niedermolekularen Banden verschwanden mit der Zeit und neue kamen hinzu bzw. verstärkten sich. Im Zelllysat lässt sich nur eine sehr hochmolekulare Bande detektieren und zusätzlich ist auch in der Auftragungstasche noch Immunreaktivität zu finden.

5.6 In vitro-Cross-linking von TCHHL1 durch Transglutaminase 1

Aus immunhistochemischen Untersuchungen der Transglutaminasen 1, 2, 3 und 5 ist bekannt, dass diese in unterschiedlichen Strukturen der Haare exprimiert werden (Akiyama et al., 2002; Thibaut et al., 2005; Thibaut et al., 2009; Yoneda et al., 1998). Transglutaminase 1 und 5 sind im distalen Anteil der äußeren Haarwurzelscheide sowie im distalen Anteil der inneren Haarwurzelscheide nachweisbar. Die Transglutaminierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen bei der enzymatisch durch Transglutaminasen (TGase) eine Isopeptidbindung zwischen einem Acyl-Donor dem γ -Carbonsäureamid des Glutamins (Gln) und einem Acyl-Akzeptor der ϵ -Aminogruppe des Lysins (Lys) gebildet wird. In den verschiedenen TCHHL1-Fragmenten sind zahlreiche Lysine und Glutamine enthalten. So enthält rTCHHL1₁₄₋₂₄₈ 16 Gln und 18 Lys, rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ 34 Gln und 26 Lys, rTCHHL1₉₀₋₂₄₈ 13 Gln und 14 Lys und rTCHHL1₃₆₉₋₄₈₉ 12 Gln und 12 Lys. Somit besteht die grundsätzliche Möglichkeit einer intra- sowie intermolekularen Quervernetzung der rTCHHL1-Fragmente durch Transglutaminasen. In einem Experiment wurden die vier rTCHHL1-Fragmente mit TGase 1 inkubiert und die resultierenden Veränderungen der biochemischen und antigenen Eigenschaften per Western-Blot Analyse untersucht (Abb. 23). Dabei konnte bei der Quervernetzung der vier verschiedenen rTCHHL1-Fragmente ein komplettes Verschwinden der Immunreaktivität der Hauptbanden und das Auftreten neuer Immunreaktivitäten bei sehr großen molekularen Massen nachgewiesen werden. Wie in Abb. 20 angegeben beträgt die errechnete molekulare Masse für rTCHHL1₁₄₋₂₃₈ 26 kDa, für rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ 45 kDa, für rTCHHL1₉₀₋₂₃₈ 17,5 kDa und für rTCHHL1₃₆₉₋₄₈₉ 18,5 kDa. Die molekulare Masse wurde für die Proteine per MS kontrolliert und bestätigt. Für alle Fragmente konnte im Verhältnis zum verwendeten Komigrationsstandard ein verändertes Laufverhalten beobachtet werden. So migrierten die rTCHHL1-Fragmente langsamer als der Komigrationsstandard, so dass die Masse der rTCHHL1-Fragmente höher zu sein scheint als sie tatsächlich ist. Ein plausibler Grund für das Auftreten mehrerer immunreaktiver Banden bei den verschiedenen Fragmenten konnte nicht ermittelt werden.

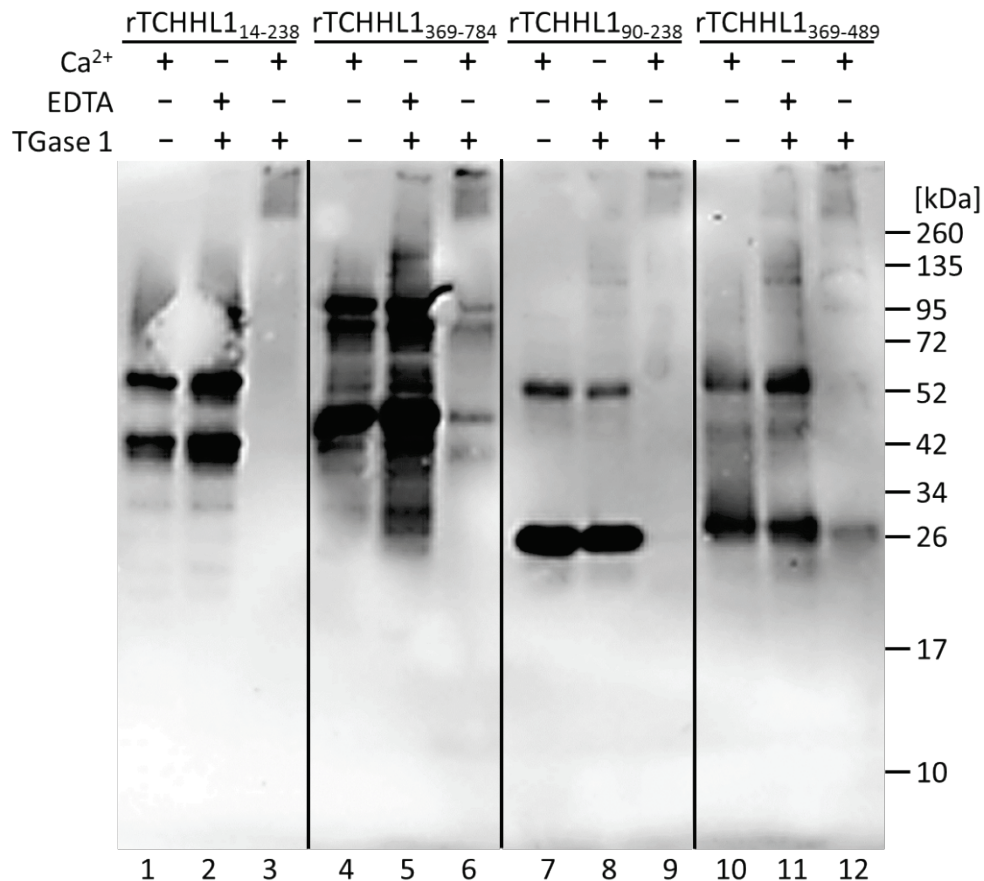


Abb. 23: Quervernetzung verschiedener TCHHL1-Fragmente mit Transglutaminase 1. In den Kontrollansätzen wurden die rekombinanten Proteine zusammen mit 10 mM CaCl₂ (Spuren 1, 4, 7, 10) oder mit inaktivierter Transglutaminase 1 (TGase 1) (+ 10 mM EDTA) (Spuren 2, 5, 8, 11) inkubiert. In den Spuren 3, 6, 9 und 12 wurde die gleiche Menge des rekombinanten Proteins mit CaCl₂-aktivierter TGase 1 inkubiert. 200 ng des Proteins wurden unter reduzierenden Bedingungen mittels 12,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine 0,2 µm NC-Membran transferiert. Die Detektion des Proteins erfolgte mit einer Mischung aus Ziege-α-rTCHHL1₁₄₋₂₄₈- und Ziege-α-hTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄-polyklonalem Antikörper. Diese Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

5.7 Die Behandlung der rTCHHL1-Fragmente mit Protein-Arginin Deiminase 1 (PAD1) führte zu einer Veränderung der Antigenität

Aus Untersuchungen der Gruppe um Michel Simon ist bekannt, dass in der Haut und den Hautanhangsgebilden die Protein-Arginin Deiminasen (PAD) 1, 2 und 3 exprimiert sind (Chavanas et al., 2006; Ying et al., 2009). Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten, dass die PAD1 und PAD3 zytoplasmatisch in den Zellen der inneren Haarwurzelscheide und der Medulla vorliegen (Peroutka III et al., 2011). Die verschiedenen PADs zeigen dabei unterschiedliche Substratspezifitäten sowie pH- und Ca²⁺-Abhängigkeiten (Mechin et al., 2005).

Die Inkubation verschiedener rTCHHL1-Fragmente mit der PAD1 führte zu einer Maskierung der Epitope (Abb. 24). So konnte für die Fragmente rTCHHL1₉₀₋₂₄₈ und rTCHHL1₃₆₉₋₄₈₉ eine stark verminderte Reaktivität mit den entsprechenden Antikörpern beobachtet werden. Das

rTCHHL1₁₄₋₂₄₈-Fragment, das einen großen Teil der S100/ „EF-hand-like“-Domäne enthält, zeigte nach PAD1-Inkubation hingegen keine Veränderung in der Antigenität, allerdings eine Veränderung der Laufeigenschaften in der SDS-PAGE. Damit wurde klar, dass der gegen das rTCHHL1₁₄₋₂₄₈ gerichtete polyklonale Antikörper verstärkt antigene Determinanten im Bereich der S100/„EF-hand-like“-Domäne erkennt. Allerdings muss dabei betrachtet werden, dass die S100/„EF-hand-like“-Domäne nur zwei der acht Arginine des Fragments enthält. Aufgrund der Struktur der Domäne sollten diese Arginine außerdem für die PAD1 schlechter zugänglich sein als die sechs Arginine in den repetitiven Einheiten.

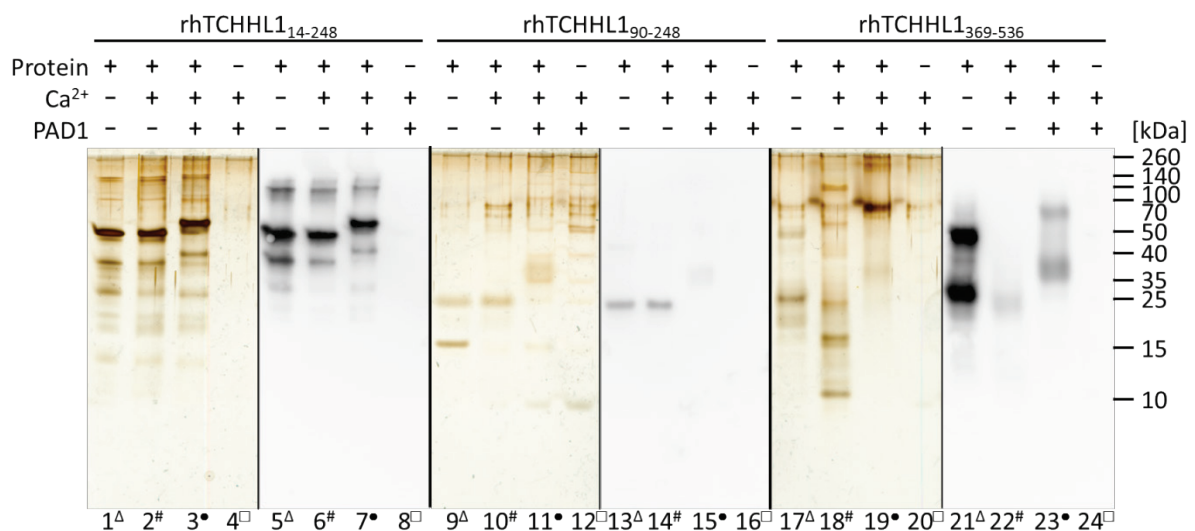


Abb. 24: Citrullinierung verschiedener rTCHHL1-Fragmente mit Protein-Arginin Deiminase 1 (PAD1). In den mit dem Dreieck (Δ) markierten Spuren wurden als Kontrollen je 300 ng des jeweiligen rTCHHL1-Fragments aufgetragen. In den mit der Raute (#) markierten Spuren wurden als weitere Kontrollen je 300 ng des jeweiligen rTCHHL1-Fragments nach 24 h Inkubation bei 50°C in Puffer (mit 10 mM Ca²⁺) aufgetragen. In den mit dem Quadrat (□) markierten Spuren wurden je 7,5 mU PAD1 in Puffer nach 24 h Inkubation bei 50°C aufgetragen. In den mit dem Punkt (•) markierten Spuren wurden je 300 ng des jeweiligen rTCHHL1-Fragments nach 24 h Inkubation bei 50°C in Puffer mit 7,5 mU PAD1 aufgetragen. Für den Proteinnachweis in den Western-Blots mit den Spuren 5 bis 8 und Spuren 13 bis 16 wurde der polyklonale Antikörper Ziege-α-rTCHHL1₁₄₋₂₄₈ verwendet. Der Western-Blot der Spuren 21 bis 24 wurde mit dem polyklonalen Antikörper Ziege-α-rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ durchgeführt. Die Silberfärbungen dienten jeweils als Beladungskontrollen. Die Fragmente enthalten unterschiedlich viele Arginine (rTCHHL1₁₄₋₂₄₈ enthält 8 Arg, rTCHHL1₉₀₋₂₄₈ enthält 7 Arg und rTCHHL1₃₆₉₋₅₃₆ enthält 12 Arg). Die in den Spuren 11 und 12 zusätzlichen Banden beruhen auf einer Kontamination mit dem Komigrationsstandard. Diese Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

5.8 Ein rTCHHL1-Fragment zeigte minimale antimikrobielle Aktivität

Aufgrund bekannter antimikrobieller Aktivität für verschiedene Fragmente des Hornerin (Wu, 2005) und des Filaggrin-2 (Hansmann, 2009) wurde untersucht, ob auch die vier rTCHHL1-Fragmente antimikrobielle Aktivitäten aufweisen. Dabei erfolgte eine Testung im Radialdiffusionstest bei neutralem pH in Anwesenheit von 1 % TSB gegen *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 11303 und ATCC 11775, *P. aeruginosa* ATCC 10145, *C. albicans* ATCC 24433 und *B. megaterium* ATCC 14581. Antimikrobielle Aktivität ließ sich nur gegen

E. coli und *B. megaterium* für das Fragment rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ bei einer Konzentration von >1 µg/µL nachweisen (Tab. 5).

Tab. 5: Antimikrobielle Aktivität verschiedener rTCHHL1-Fragment gegen *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* und *B. megaterium*. Ergebnisse aus der Testung in der Radialdiffusion. Eingesetzt wurden 5 µl der Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 µg/µL in 0,01% Essigsäure bei einem pH-Wert von 7,3 und der Verwendung von 1 % TSB im „Underlay“. - = kein Test durchgeführt; kH = keine Hemmung; HHHH = abgegrenzter Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof; der Zahlenwert gibt den Mittelwert des Hemmhofdurchmessers aus verschiedenen Testungen an; das 3 mm Stanzloch, in das die Proteinlösung eingefüllt wurde, wurde vom Hemmhofdurchmesser nicht subtrahiert. Die Testungen wurden für rTCHHL1₁₄₋₂₄₈ und rTCHHL1₃₆₉₋₄₈₉ zweimal und für rTCHHL1₉₀₋₂₄₈ und rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ dreimal durchgeführt. Als Kontrollsubstanz wurden 5 µl einer Lysozymlösung in 0,01% Essigsäure mit einer Konzentration von 0,1 µg/µL eingesetzt. Die Hemmhöfe für die Lysozymkontrolle waren immer klar, deshalb wird hier nur der Durchmesser angegeben.

| | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | <i>E. coli</i> ATCC 11303 | <i>E. coli</i> ATCC 11775 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 | <i>C. albicans</i> ATCC 24433 | <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| rTCHHL1 ₁₄₋₂₄₈ | kH | - | kH | kH | kH | HHHH 4,5 |
| rTCHHL1 ₉₀₋₂₄₈ | kH | kH | - | kH | kH | - |
| rTCHHL1 ₃₆₉₋₇₈₄ | kH | HHHH 4,0 | - | kH | kH | - |
| rTCHHL1 ₃₆₉₋₄₈₉ | kH | - | kH | kH | kH | HHHH 4,5 |
| Lysozym | 6 | 7 | 6,1 | 5 | 6,7 | 12,6 |

5.9 Expression rekombinanter humaner HRNR-Fragmente

Aus vorherigen Untersuchungen gab es Hinweise auf eine antimikrobielle Aktivität von Gemischen verschiedener HRNR-Fragmente aus Stratum corneum-Extrakten. Um die antimikrobiellen Eigenschaften definierter Hornerinfragmente untersuchen zu können, wurden verschiedene Bereiche aus dem Protein rekombinant hergestellt. Ausgangspunkt aller Untersuchungen war ein Peptid mit antimikrobieller Aktivität, das in einer HPLC-Fraktion von Kallus-Extrakten gefunden wurde (Wu et al., 2009b). Dabei handelte es sich um ein partiell gereinigtes HRNR-Peptid, das anhand von massenspektrometrischen Untersuchungen dem Abschnitt von Aminosäure 2591 bis 2684 des Hornerins zugeordnet werden konnte. Ausgehend von diesem Fragment wurden verschiedene weitere Fragmente rekombinant generiert (Tab. 12 im Anhang). Es wurden Amino- und Carboxy-terminal verlängerte Fragmente, verkürzte Fragmente sowie Fragmente mit Punktmutationen hergestellt. Dabei sollte untersucht werden, welche Aminosäuren bzw. Strukturelemente wichtig sind und welche Wirkmechanismen der Aktivität zugrunde liegen. Die Aufreinigung eines dieser rekombinanten Proteine ist im nächsten Abschnitt beispielhaft dargestellt.

5.9.1 Aufreinigung und Hydrolyse eines Fusionsproteins

Die Expression erfolgte im SUMO-Expressionssystem, dessen Protease sehr spezifisch nur nach dem Fusions-„Tag“ schneidet. Für die Expression wurden *E. coli*-Zellen des Stammes Rosetta-gami 2 verwendet. Diese enthielten das pRARE2-Plasmid, das für zusätzliche, normalerweise in *E. coli* seltene, tRNAs kodiert. Nach der Expression und dem Aufschluss der Bakterien per Ultraschall wurde das Fusionsprotein über eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) isoliert (Abschnitt 4.6.1.1). Dabei konnte mit Hilfe eines Imidazolgradienten eine bei 280 nm absorbierende Fraktion isoliert werden (Abb. 25), in der in einer späteren massenspektrometrischen Analyse das gewünschte Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte.

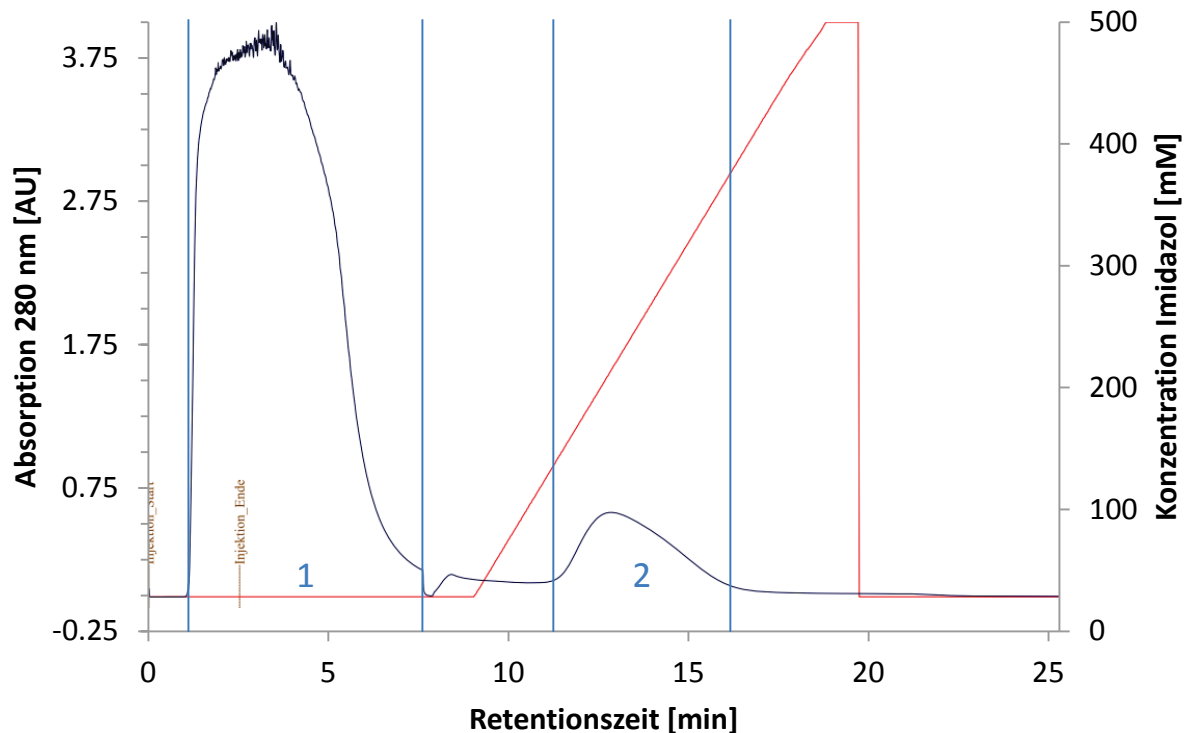


Abb. 25: Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) eines rekombinant exprimierten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsproteins. Gezeigt ist die Absorption in „absorbance units“ (AU) bei 280 nm (blaue Linie) und der Verlauf des Imidazolgradienten (rote Linie) aufgetragen gegen die Retentionszeit. Mit den vertikalen blauen Linien sind zwei Fraktionen markiert. Fraktion 1 enthielt das ungebundene Bakterienlysat und Fraktion 2 das eluierte Fusionsprotein.

Für einen Teil der eluierten Fraktion erfolgte eine Aufreinigung per Umkehrphasen-Ionenpaar-Chromatographie (IP-RPC) (Abschnitt 4.6.3). Hiermit sollte bestimmt werden ob neben dem erwarteten Fusionsprotein noch weitere Proteine in der eluierten Fraktion zu detektieren sind. Außerdem sollte so das Protein vom Imidazol und Salz getrennt werden um es für eine massenspektrometrische Analyse vorzubereiten (Abb. 26). Es wurden nur zwei Fraktionen nach der Absorption bei 215 nm aufgefangen. Die erste Fraktion enthielt das Imidazol, Salz sowie alle sonstigen ungebundenen Moleküle. In der zweiten Fraktion konnte in einer späteren massenspektrometrischen Analyse das Fusionsprotein nachgewiesen werden.

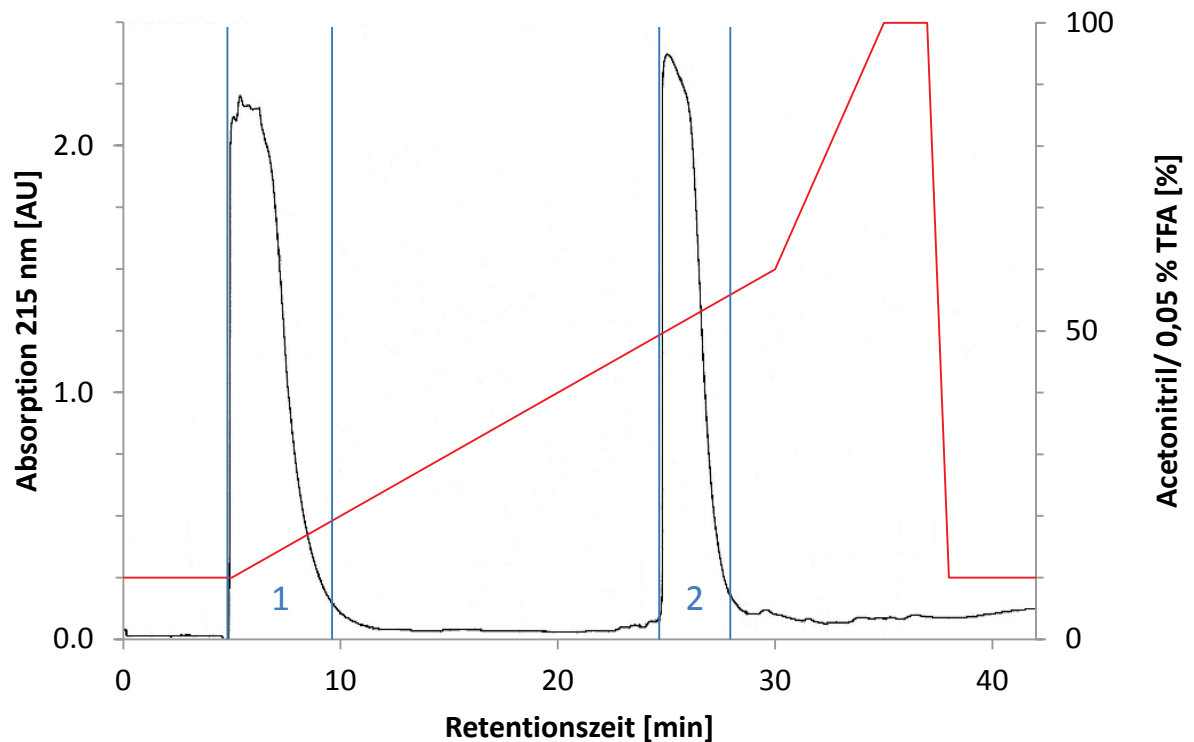


Abb. 26: Umkehrphasen-Ionenpaar-Chromatographie (IP-RPC) eines rekombinant exprimierten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsproteins. Gezeigt ist die Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Verlauf des Acetonitrilgradienten (rote Linie). Die zuvor über IMAC aufgereinigte Probe wurde auf eine präparative C8-RP-HPLC-Säule aufgetragen und mit einem H₂O/ 0,05 % TFA - Acetonitril/ 0,05 % TFA-Gradienten eluiert. Mit den vertikalen blauen Linien sind zwei Fraktionen markiert. Fraktion 1 enthielt Imidazol, Salz sowie alle sonstigen ungebundenen Moleküle, Fraktion 2 das eluierte Fusionsprotein.

Die erste Fraktion enthielt das ungebundene Material und wurde verworfen. Von der zweiten Fraktion wurde ein geringes Volumen eingetrocknet, im MS-Laufmittel aufgenommen und mittels ESI-MS (Abschnitt 4.7) die molekulare Masse bestimmt. Trotz sehr großer Mengen des Fusionsproteins konnte nur ein sehr geringes Signal detektiert werden (Abb. 27A). Die Ursache für die geringe Signalintensität konnte nicht ermittelt werden. Aus dem Rohdatenspektrum wurde per Dekonvolution mittels MaxEnt1 die molekularen Massen von 20707,8 Da, 20724,6 Da, 20741,9 Da, 20757,8 Da und 20774,6 Da (Abb. 27B) ermittelt. Die aus der Proteinsequenz errechnete molekulare Masse für das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsprotein beträgt 20711,1 Da. Das Fusionsprotein enthält 4 Methionine im Fusions-„Tag“, die alle oxidiert werden können, und so die molekulare Masse um ca. 16 Da erhöhen auf 20727,1 Da, 20743,1 Da, 20759,1 Da und 20775,1 Da.

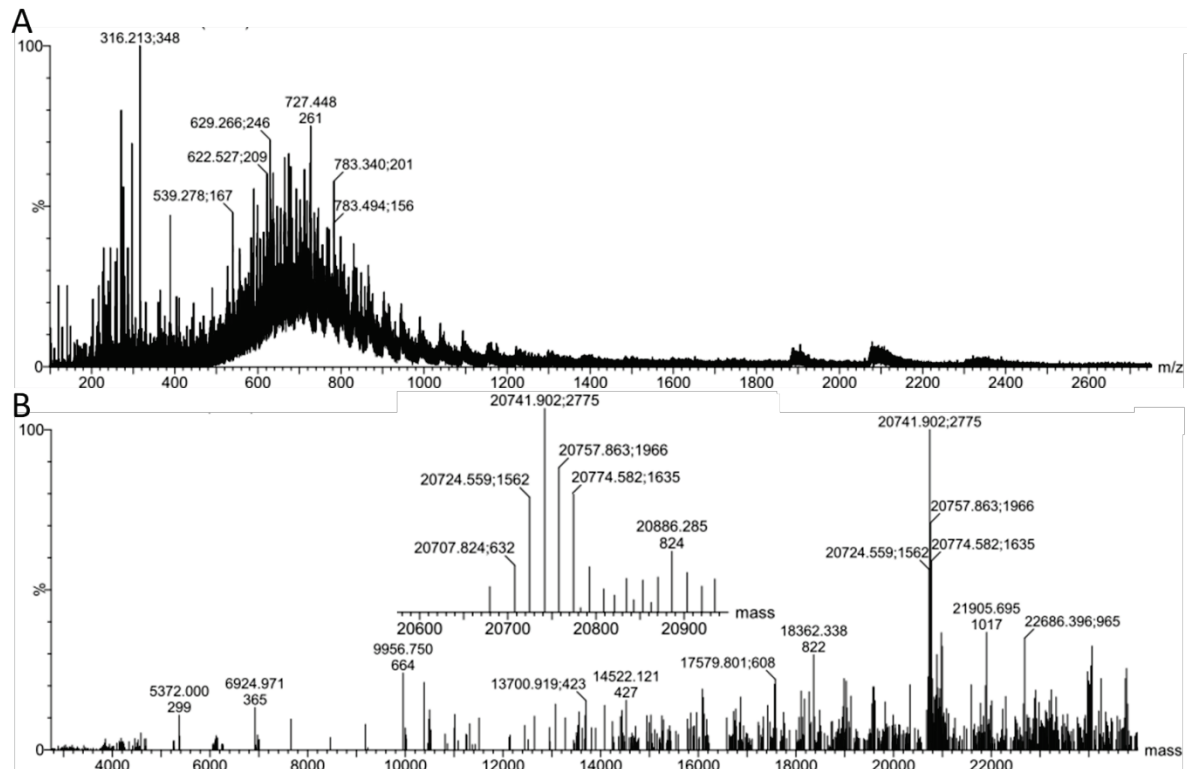


Abb. 27: ESI-Massenspektrometrie (MS) eines rekombinant exprimierten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsproteins. **A)** Das Rohdatenspektrum entspricht 102 s Messzeit. **B)** Das Spektrum zeigt das per Dekonvolution mittels MaxEnt1 aus dem Rohdatenspektrum berechnete Spektrum der molekularen Massen mit einem vergrößerten Ausschnitt des Spektrums. Die errechnete molekulare Masse für das Fusionsprotein beträgt 20711,1 Da. Die beobachteten Massendifferenzen lassen sich durch eine mögliche Oxidation (+16 Da) einer unterschiedlichen Anzahl der vier in dem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsprotein vorhandenen Methionine erklären. Eine Oxidation der Methionine des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsproteins würde zu einer molekularen Masse von 20727,1 Da, 20743,1 Da, 20759,1 Da und 20775,1 Da führen. Generell war die Signalintensität für die Fusionsproteine sehr niedrig. Auch bei höheren Konzentrationen konnte kein besseres Signal erreicht werden.

Um größere Mengen des Fusionsproteins zu reinigen wurde das Protein aus der IMAC im nächsten Schritt per Größenausschlusschromatographie (SEC) gegen PBS entsalzt (Abschnitt 4.6.2). Die Trennung zwischen Protein, Imidazol und NaCl konnte anhand der Absorption bei 280 nm und der Leitfähigkeit verfolgt werden (Abb. 28). In der ersten Fraktion befand sich das Fusionsprotein, während die zweite Fraktion das Imidazol sowie das NaCl enthielt. Welcher Bestandteil der Probe für die Absorption bei 280 nm in der zweiten Fraktion verantwortlich war konnte nicht geklärt werden. Eine mögliche Ursache könnte eine Verunreinigung des Imidazols gewesen sein.

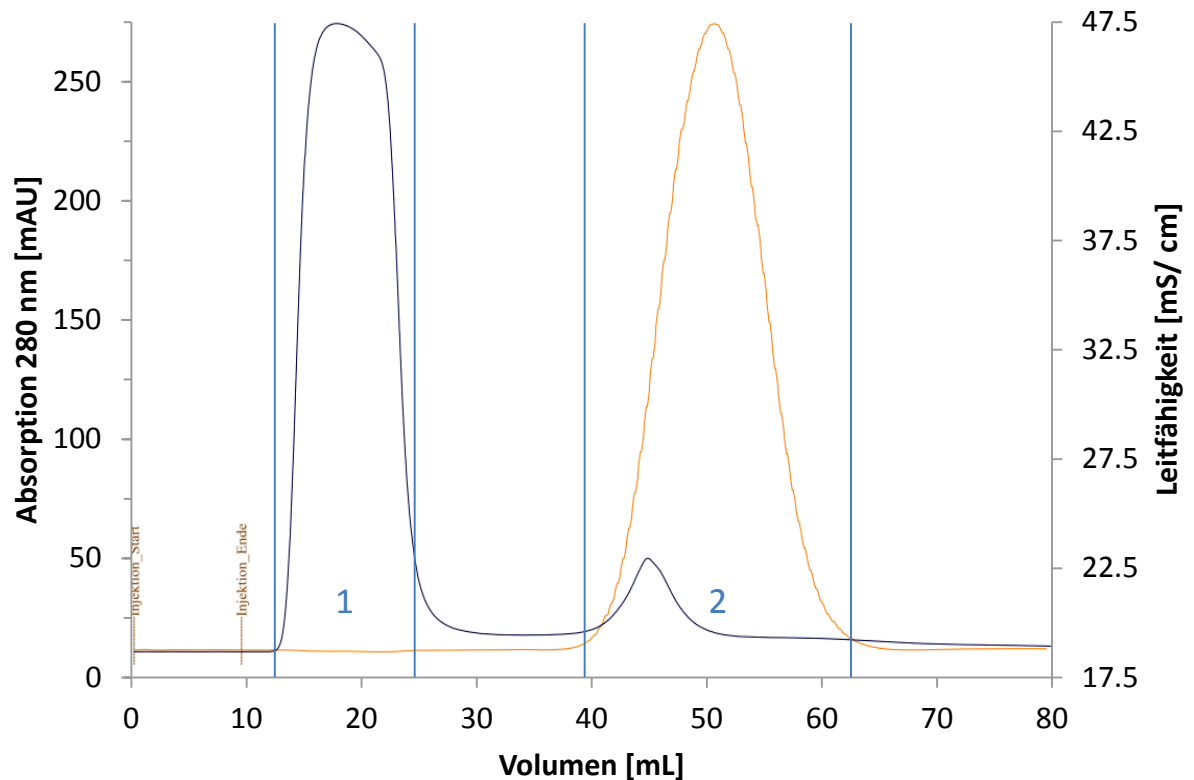


Abb. 28: Größenausschlusschromatographie (SEC) eines rekombinant exprimierten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsproteins.

Gezeigt ist die Absorption in mAU bei 280 nm (blaue Linie) und Leitfähigkeit (orangefarbene Linie). Als Laufmittel wurde PBS verwendet. Mit den vertikalen blauen Linien sind die beiden Fraktionen markiert. Fraktion 1 enthielt das Fusionsprotein, Fraktion 2 das Salz und Imidazol aus der IMAC.

Das in PBS umgepufferte Fusionsprotein aus der SEC wurde genau wie das aus der IP-RPC kommende Fusionsprotein mit Hilfe der SUMO-Protease 2 in Gegenwart von 5 mM DTT bei 30°C über Nacht geschnitten. Dabei wird Aminosäuregenau nach der Carboxy-terminalen Aminosäure des „Tag“ die Peptidbindung hydrolysiert. Dieser Ansatz wurde erneut per IP-RPC (Abb. 29) aufgetrennt. Neben dem ungebundenen Material, das innerhalb der ersten 10 min detektiert wurde, konnten zwei weitere Peaks bei 15 % und 35 % Acetonitril detektiert werden.

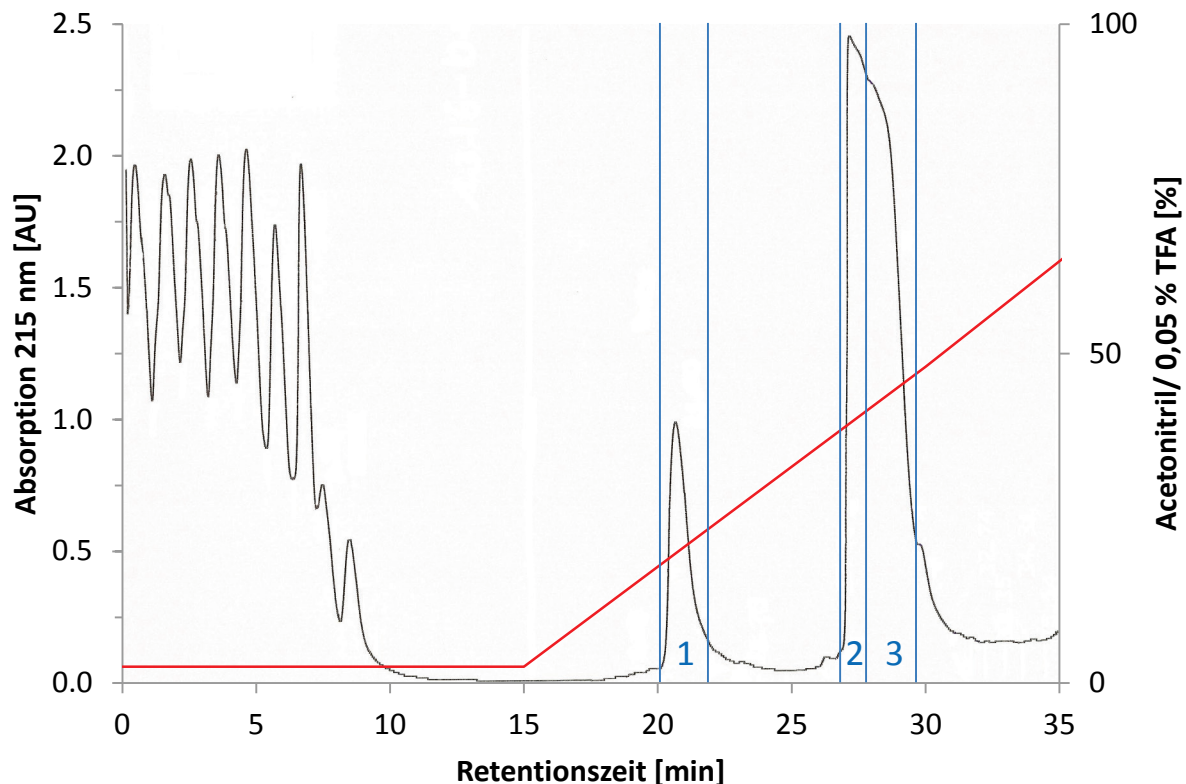


Abb. 29: Umkehrphasen-Ionenpaar-Chromatographie (IP-RPC) eines mit SUMO-Protease 2 gespaltenen rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsproteins. Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (rote Linie). Rechts ist die Konzentration des Eluenten aufgetragen. Durch die vertikalen blauen Linien sind die Fraktionen markiert, die die unterschiedlichen Proteine enthalten. Fraktion 1 enthielt das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄, Fraktion 2 das ungeschnittene rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsprotein und Fraktion 3 das pSUMO3-Fusionsprotein.

Der zweite Peak zeigte eine leichte Schulter, so dass in der folgenden ESI-MS-Analyse insgesamt 3 Fraktionen analysiert wurden. Für die Fraktion 1 wurde eine molekulare Masse von 9211,3 Da bestimmt (Abb. 30 A), die mit der errechneten Masse für das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ von 9210,2 Da übereinstimmt. Für die Fraktion 2 konnte im Rohdatenspektrum, wie schon oben beschrieben, nur ein niedriges Signal detektiert werden (Abb. 30 B). Die per Dekonvolution mittels MaxEnt1 berechneten molekularen Massen zeigten kein eindeutiges Ergebnis, allerdings konnte unter anderem eine Masse von 20777,5 Da errechnet werden, die der an den 4 Methioninen oxidierten Masse des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsproteins von 20775,1 Da entsprechen würde. Für die Fraktion 3 wurde eine molekulare Masse von 11568,1 Da und 11584,4 Da ermittelt (Abb. 30 C), die der Masse des dreifach oxidierten (11566,8 Da) bzw. vierfach oxidierten (11582,8 Da) pSUMO3-Proteins entspricht.

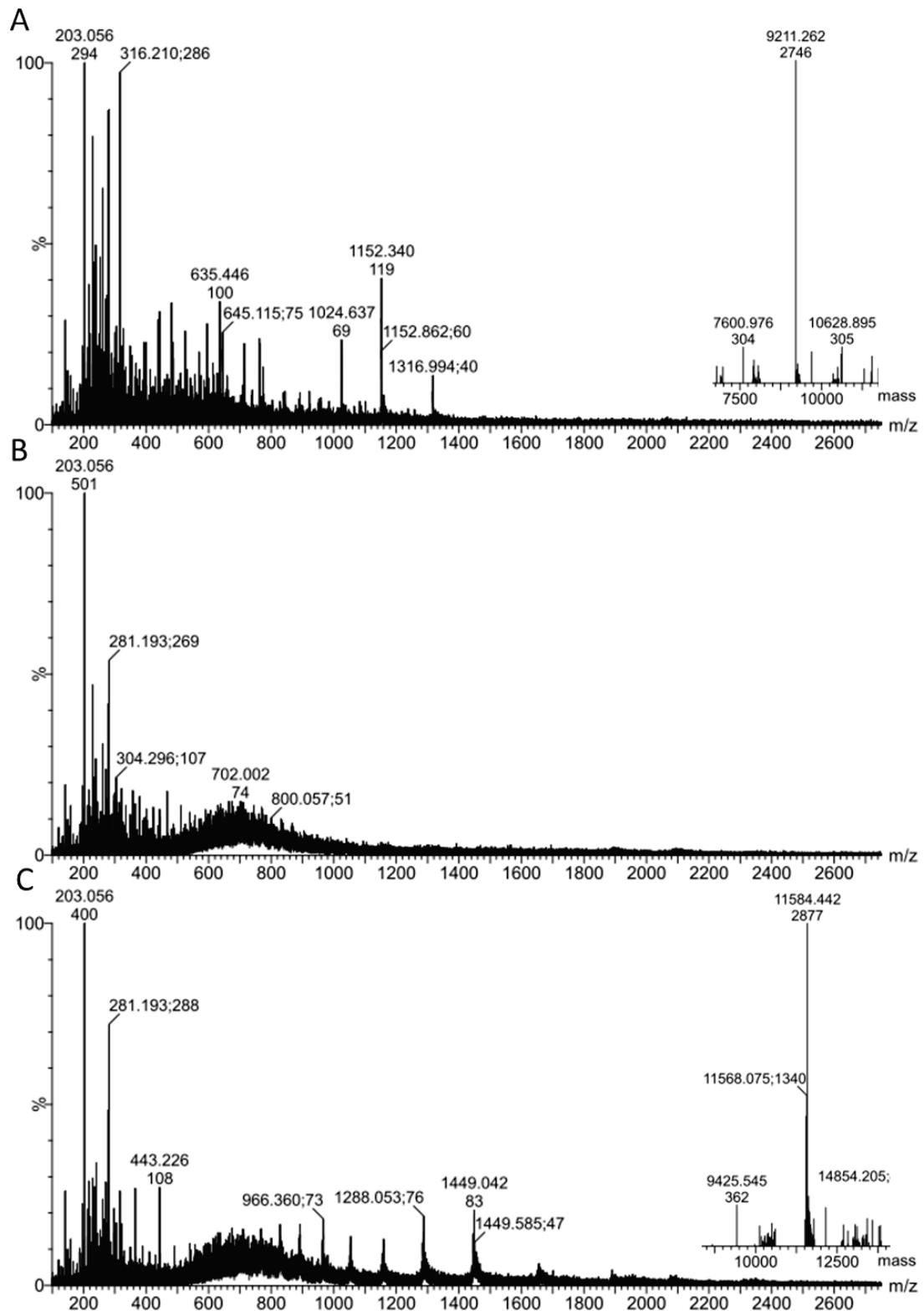


Abb. 30: ESI-Massenspektrometrie (MS) der drei Fraktionen aus der IP-RPC. Die in A – C abgebildeten Spektren zeigen die Rohdaten; diese entsprechen 206 s Messzeit. Die beiden kleinen Spektren auf der rechten Seite zeigen die per Dekonvolution mittels MaxEnt1 aus den Rohdatenspektren berechneten molekularen Massen. Aufgrund des fehlenden Signals im Rohdatenspektrum B konnte hier keine eindeutige Masse für das Fusionsprotein bestimmt werden. Die errechnete molekulare Masse für das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ beträgt 9210,2 Da, die für das pSUMO3-Protein 11518,8 Da. Das pSUMO3-Protein enthält vier Methionine. Ein dreifach oxidiertes pSUMO3-Protein weist eine molekulare Masse von 11566,8 Da, ein vierfach oxidiertes pSUMO3-Protein eine Masse von 11582,8 Da auf.

5.10 Physikochemische Eigenschaften des Hornerins

5.10.1 Anwendung des Glycinloop-Modells auf Hornerin.

Basierend auf dem Glycinloop-Modell von Steinert et al. wurde eine Struktur für das rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ postuliert (Steinert et al., 1991). In Abb. 31 ist die postulierte Struktur für dieses Fragment dargestellt. Die Struktur beruht auf der Interaktion der aromatischen und langkettig aliphatischen Aminosäuren in Kombination mit der hohen Flexibilität der dazwischenliegenden Loopstrukturen, die hauptsächlich aus den beiden kleinen Aminosäuren Glycin und Serin bestehen.

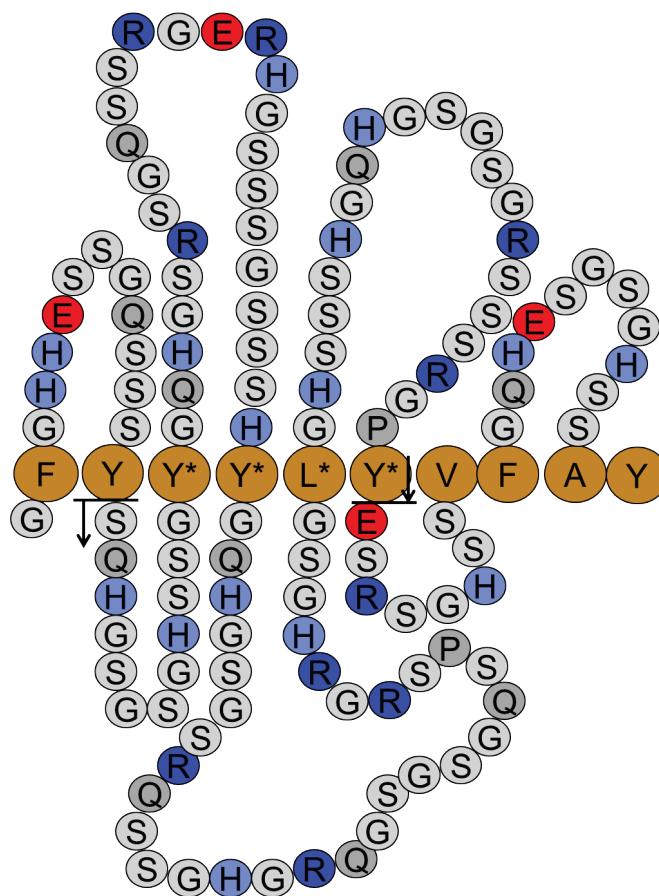


Abb. 31: Glycinloopmodell für HRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇. Jeder Kreis steht für eine Aminosäure der Sequenz des Fragments. Die aromatischen und langkettig aliphatischen Aminosäuren sind in braun dargestellt. Zwischen diesen Aminosäuren kommt es dem Modell nach zu hydrophoben Interaktionen, so dass diese Aminosäuren die Struktur vorgeben. Der hohe Anteil von Glycinen und Serinen (hellgrau) ermöglicht eine sehr hohe Flexibilität. Die basischen Aminosäuren Histidin (hellblau) und Arginin (dunkelblau) und die saure Aminosäure Glutaminsäure (rot) sind farblich abgehoben dargestellt. Prolin und Glutamin sind in grau dargestellt. Mit den Trennstrichen und den Pfeilen ist das Fragment HRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄, gekennzeichnet. In diesem Fragment wurden die die drei Tyrosine und das Leucin (jeweils mit einem Stern markiert) in Glycin mutiert.

Ein Vergleich der antimikrobiellen Eigenschaften des HRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ mit HRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ zeigte eine nahezu identische antimikrobielle Aktivität (Abb. 39). Aufgrund dieser Erkenntnis und der Tatsache, dass im HRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ insgesamt 10 aromatische und langkettig aliphatische

Aminosäuren vorhanden sind, wurde das HRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ für die Untersuchung ausgewählt. Um zu klären, ob die in diesem Modell beschriebene Struktur für die antimikrobielle Aktivität des Hornerinfragments verantwortlich ist, wurden die drei Tyrosine und das Leucin im rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ sequenziell durch Glycine ersetzt (Tab. 12 im Anhang). Dieses HRNR-Fragment zeigte im Vergleich mit dem ursprünglichen Fragment eine nur geringfügig veränderte antimikrobielle Aktivität (Abschnitt 5.11.1).

5.10.2 Die CD-Spektroskopie bestätigt die hohe Flexibilität verschiedener rHRNR-Fragmente

Ausgehend von dem Glycinloop-Modell wurden Überlegungen hinsichtlich der Sekundärstruktur des Hornerins bzw. der Hornerinfragmente angestellt. Um genauere Informationen über die Sekundärstrukturelemente des Hornerins zu bekommen, wurden verschiedene Hornerinfragmente mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht (Abschnitt 4.8). Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Abb. 32 gezeigt. Es ließen sich nur ungeordnete Strukturen in den vier Fragmenten rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇, rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄, rHRNR₂₄₉₁₋₂₆₈₄ mit 4 Mutationen und citrulliniertes rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ nachweisen. Typische Sekundärstrukturelemente wie α -Helix oder β -Faltblätter konnten anhand der Spektren nicht nachgewiesen werden. Ein Erhitzen auf 90°C und eine sich anschließende Rückkühlung auf 20°C zeigte keine Veränderung in den Absorptionseigenschaften der Proteine. Damit wurde das postulierte Fehlen von Strukturelementen, die durch das Erwärmen denaturiert werden könnten, experimentell bestätigt. Der Circular dichroismus ist definiert als die Differenz des molaren Absorptionskoeffizienten zwischen links- und rechtscircularpolarisiertem Licht einer bestimmten Wellenlänge (Chemes et al., 2012). Die in der Abb. 32 dargestellten Ergebnisse aus der CD-Spektroskopie zeigen die Abhängigkeit der Elliptizität in mdeg von der Wellenlänge sowie die Temperaturabhängigkeit der Elliptizität in mdeg bei einer Wellenlänge von 200 nm. Die Ursache der molaren Elliptizität liegt darin, dass die links- und rechtscircularpolarisierten Lichtstrahlen trotz anfänglich gleicher Amplitude (d.h. der kombinierte Lichtstrahl ist planar polarisiert) nach dem Durchgang durch die Probenlösung unterschiedliche Amplituden besitzen. Als Folge davon ist der kombinierte austretende Lichtstrahl elliptisch polarisiert. Seine Elliptizität wird in Grad (mdeg) gemessen.

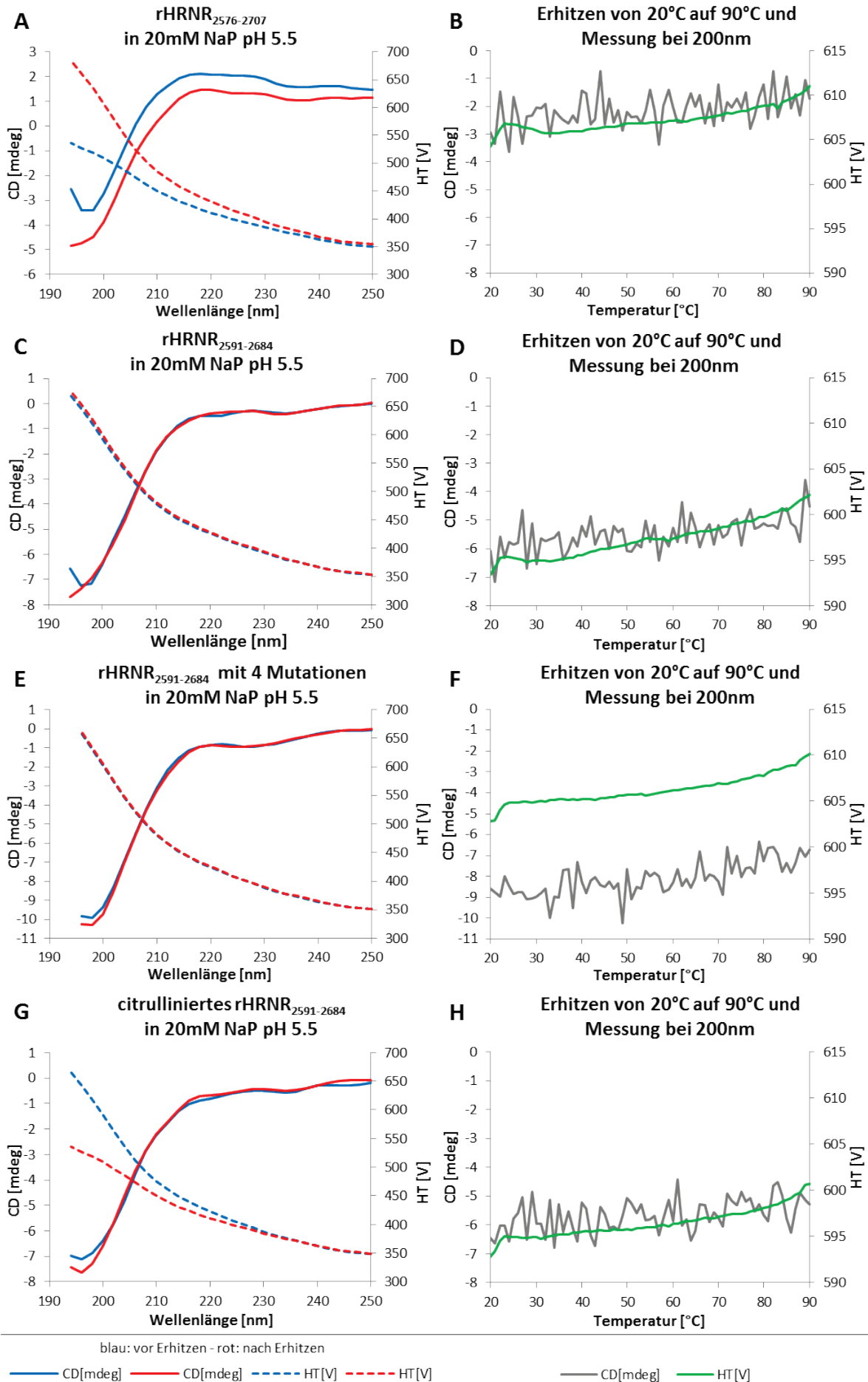


Abb. 32: CD-Spektroskopie von verschiedenen rHRNR Fragmenten. **A, C, E und G** zeigen die Abhängigkeit der Elliptizität CD [mdeg] von der Wellenlänge [nm] bei einer Temperatur von 20°C. Dargestellt ist die Basislinie vor Erhitzung auf 90°C (blau) und nach Rückkühlung von 90°C auf 20°C (rot). Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus jeweils drei Messungen. Zu erkennen ist, dass die Erhitzung des Proteins die Sekundärstruktur des Proteins nicht verändert, da der Verlauf vor und nach dem Erhitzen nahezu identisch ist. **B, D, F und H** zeigen die Abhängigkeit der Elliptizität CD [mdeg] von der Temperatur [°C] bei einer konstanten Wellenlänge von 200 nm. Da es sich um eine Einzelmessung handelt, schwankt die Elliptizität stark, ändert sich in der Tendenz aber nahezu nicht. Dieses entspricht keiner Schmelzkurve und deutet darauf hin, dass die rHRNR-peptide sehr flexibel sind.

5.10.3 Hornerin ist ein „intrinsically disordered protein“

Die Daten aus der CD-Spektroskopie weisen auf eine sehr flexible Struktur ohne typische Sekundärstrukturelemente hin. Darüber hinaus zeigten die HRNR-Fragmente weitere Auffälligkeiten, die für die Gruppe der „intrinsically disordered proteins, IDPs“ typisch sind (Tantos et al., 2013). Zu diesen Eigenschaften zählen eine große Anzahl meistens negativer unkompensierter Ladungen, die zu einer hohen Ladung der Proteine bei neutralem pH führen. Für diese Gruppe von Proteinen ist eine geringe Anzahl an hydrophoben Aminosäuren charakteristisch, die normalerweise in globulären Proteinen den hydrophoben Kern bilden (Campen et al., 2008). In Abb. 33 ist die Aminosäurezusammensetzung für das vollständige Hornerinmolekül wiedergegeben. Die untersuchten Hornerin-Fragmente entsprechen mit geringfügigen Abweichungen der Zusammensetzung des Gesamtproteins, was sich dadurch erklären lässt, dass das Hornerin zu ca. 94 % aus den untersuchten repetitiven Einheiten besteht. Bei den anderen SFTPs nehmen die repetitiven Einheiten ebenfalls den größten Anteil der Proteinsequenz ein (Abb. 16). Für die 5 anderen SFTPs wurde der Anteil der die Unordnung begünstigenden Aminosäuren ebenfalls ermittelt. Dieser liegt für TCHH bei 81,2 %, für RPTN bei 73 %, für FLG bei 81,7 %, für FLG2 bei 78,8 % und für CRNN bei 63,4 %. Somit könnte es sich bei diesen Proteinen ebenfalls um IDPs handeln.

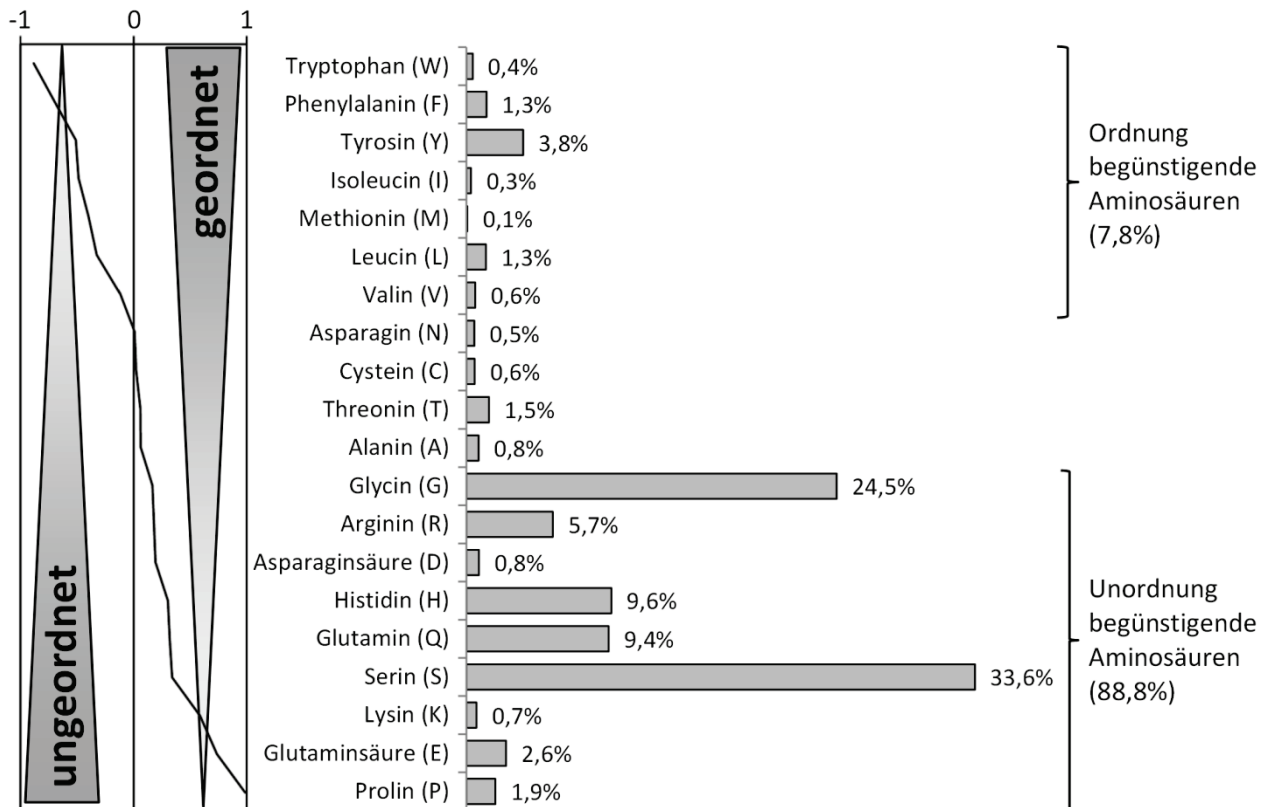


Abb. 33: Aminosäurezusammensetzung des HRNRs. Die Aminosäuren sind so angeordnet, dass oben die eine geordnete Struktur begünstigenden Aminosäuren und unten die „intrinsically disordered protein, IDP“-begünstigenden Aminosäuren aufgelistet sind. Den Einfluss der jeweiligen Aminosäure auf die Struktur entspricht der TOP-IDP-Skala bei der jeder Aminosäure ein Wert zwischen -1 und 1 zugeordnet wird. Dieser Wert ist in dem Graphen auf der linken Seite für jede Aminosäure dargestellt. Dabei entspricht der Wert -1 einer Aminosäure, die eine geordnete Struktur bedingt und der Wert 1 einer Aminosäure, die eine ungeordnete Struktur unterstützt (Campen et al., 2008). Der Anteil der Aminosäuren, die eine ungeordnete Struktur begünstigen, beträgt 88,8 %, der Anteil, der eine geordnete Struktur bedingt, beträgt dagegen 7,8%.

Als weitere Eigenschaft der IDPs ist ein verändertes Laufverhalten bzw. vom Komigrationsstandard abweichende Rf-Werte und in der SDS-PAGE typisch (Iakoucheva et al., 2001; Tompa, 2002). Der Rf-Wert ist der Quotient aus der Strecke zwischen Auftragungstasche und Proteinbande und der Strecke zwischen Auftragungstasche und der Lauffront des Probenpuffers. In der SDS-PAGE-Analyse wurde unter allen getesteten Bedingungen eine im Vergleich mit dem Komigrationsstandard zu geringe Laufgeschwindigkeit beobachtet. Dieses ist eine für die IDPs bekannte Eigenschaft, und beruht auf den nicht-idealen Eigenschaften der IDPs. Die in der SDS-PAGE-Analyse verwendeten Proteine des Komigrationsstandards sind idealerweise globulär und interagieren nicht mit der Gelmatrix. In Abb. 34A sind die Ergebnisse aus verschiedenen, mit Silber gefärbten SDS-PAGE-Analysen gezeigt, die dieses veränderte Laufverhalten verdeutlichen. Alle Proteine wurden nach der Aufreinigung per Massenspektrometrie analysiert, so dass die genaue Masse der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine bekannt war. So wurde für das rHRNR₁₀₇₅₋₁₁₇₂ (pI: 10,03) per ESI-MS

eine Masse von 9409 Da bestimmt. In der gelelektrophoretischen Trennung wurde das Protein sowohl im Western-Blot als auch in der Silberfärbung bei einer Masse, verglichen mit dem Komigrations-standard, von 23-28 kDa detektiert. Für rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ (pI: 10,83) mit einer per MS bestätigten molekularen Masse von 13105 Da wurde in der Gelelektrophorese eine molekulare Masse von 22-25 kDa bestimmt. Ähnlich verhält es sich mit rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ (pI: 11,91) mit einer per MS bestimmten molekularen Masse von 9210 Da und einer molekularen Masse in der SDS-PAGE von 14-17 kDa sowie dem vierfach mutierten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ (pI: 12,54) mit einer MS-Molekülmasse von 8836 Da, das in der SDS-PAGE-Analyse entsprechend einer molekularen Masse von 16-18 kDa migriert.

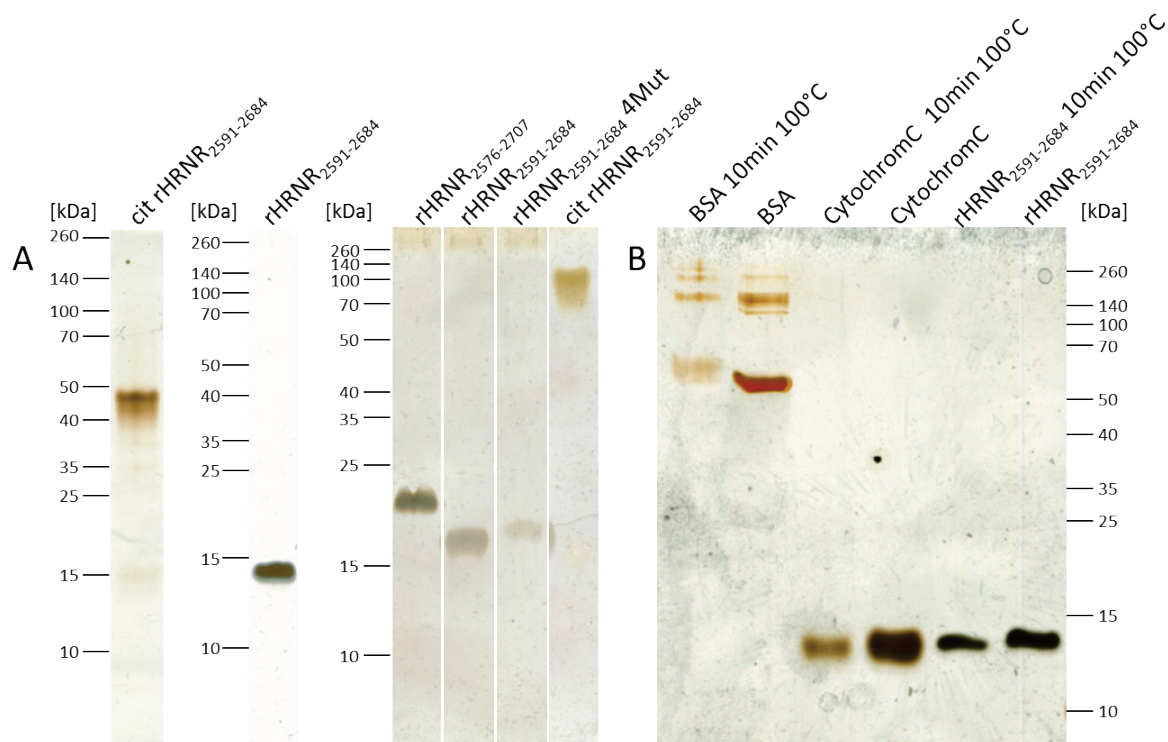


Abb. 34: Eigenschaften der Hornerinfragmente in der Silber gefärbten SDS-PAGE. A) verändertes Laufverhalten bzw. untypische Rf-Werte in der SDS-PAGE im Vergleich mit den in der Massenspektrometrie ermittelten Werten (Iakoucheva et al., 2001; Tompa, 2002) **B)** Thermische Stabilität von rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im Vergleich mit den beiden Proteinen BSA und Cytochrom C. Für die beiden Proteine BSA und CytC ist eine deutliche Signalreduktion nach Erhitzen zu erkennen (Cortese et al., 2005; Etoh et al., 1986), diese Reduktion des Signals fällt für das Hornerinfragment sehr viel geringer aus. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Gel aus vier Versuchen.

Die weitaus größten Unterschiede zeigt das mit Protein-Arginin Deiminase 1 (PAD1) umgesetzte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄. Hierbei werden, wie schon im Abschnitt 5.7 beschrieben, die Arginine enzymatisch zu Citrullin umgesetzt. Für das citrullinierte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ (pI: 7,35) wurde per MS-Analyse eine molekulare Masse von 9219 Da bestimmt, in der SDS-PAGE wurde allerdings eine molekulare Masse von 45-90 kDa detektiert. Diese großen Unterschiede sind umso erstaunlicher, da durch die Deiminierung der isoelektrische Punkt vom hochgradig

kationischen 11,91 auf neutrale 7,35 verschoben wird. Aufgrund der hohen Flexibilität der IDPs führt eine Erwärmung des Proteins auf 100°C über einen Zeitraum von 10 Minuten nicht zu einer Denaturierung. Im Vergleich mit BSA und Cytochrom C bestätigt sich die fehlende Sensitivität gegenüber erhöhten Temperaturen (Abb. 34B).

5.10.4 Hornerin zeigt eine erhöhte Proteolyseempfindlichkeit

Bei der rekombinanten Expression verschiedener Hornerinfragmente im pET32a-Vektor mit anschließendem proteolytischen Verdau des Fusionsproteins mit der Enteropeptidase EKMax zeigte sich eine erhöhte Proteolyseempfindlichkeit des Hornerins, so dass bei der chromatographischen Reinigung nur der „Tag“, nicht aber das Zielprotein wiedergefunden wurde.

Die proteolytische Empfindlichkeit wurde intensiver an den beiden Hornerinfragmenten rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ und rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ untersucht. Anfangs wurde 10 µg des Hornerinfragments rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ mit verschiedenen Proteasen über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Proteasen Trypsin und Thermolysin sind in dem entsprechenden Fragment 10, für Chymotrypsin 8 hypothetische Schnittstellen vorhanden. Für diese 3 Proteasen wurde untersucht, welche Proteasemenge für einen Verdau notwendig ist. Die Versuche zeigten, dass bei einer Inkubation über Nacht schon sehr geringe Mengen an Protease, nämlich 1 pg Trypsin, 10 pg Chymotrypsin und 1 ng Thermolysin ausreichten, um einen Verdau des Proteins einzuleiten (Abb. 35). Die beiden Proteasen EKMax und Lys-C sollten das rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ nicht schneiden, da die entsprechende Sequenz weder Lysin und noch Asparagin enthält. Trotzdem sind bereits 0,01 U Enterokinase und 10 ng Lys-C in der Lage, rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ hydrolytisch zu spalten.

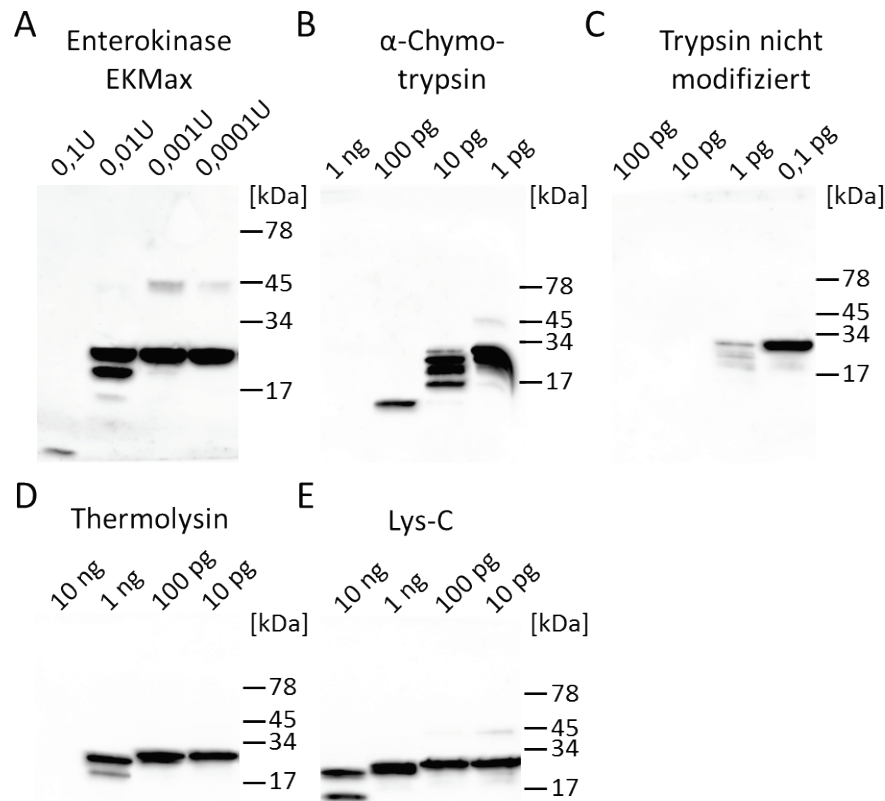


Abb. 35: Proteolyseempfindlichkeit von rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇. In jedem Ansatz wurden 10 µg rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ mit der entsprechenden Menge der Protease über einen Zeitraum von 18 h bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-Blot mit dem α-HRNR₂₅₉₁₋₂₆₆₂-Antikörper detektiert. Verwendet wurden (A) 0,1 U bis 0,0001 U Enterokinase EKMax, (B) 1 ng bis 1 pg α-Chymotrypsin, (C) 100 pg bis 0,1 pg Trypsin (nicht modifiziert), (D) 10 ng bis 10 pg Thermolysin und (E) 10 ng bis 10 pg Lys-C. Das Experiment wurde mit jeder Protease mindestens zweimal durchgeführt.

Um die Proteaseempfindlichkeit des Hornerins besser einordnen zu können, wurde diese mit den beiden Proteinen Albumin aus Rinderserum (BSA) und Cytochrom C verglichen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C mit den beiden Metalloproteasen Thermolysin und Kollagenase sowie den drei Serinproteasen Lys-C, Proteinase K und modifiziertem Trypsin. Es erfolgte eine Auftrennung in der SDS-PAGE und anschließend eine Silberfärbung.

Für Trypsin lassen sich im BSA 82, für Cytochrom C 20 und für das verwendete Hornerinfragment (rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄) 9 hypothetische Schnittstellen nachweisen. Beim BSA wurden bei Verwendung von 10 ng modifiziertem Trypsin erste Veränderungen erkannt (Abb. 36A). Allerdings verschwanden die Banden auch bei der Verwendung der zehnfachen Menge Trypsin nicht vollständig. Beim Cytochrom C konnten auch bei Verwendung von 100 ng modifiziertem Trypsin keine Veränderungen detektiert werden. Beim Hornerin waren 100 pg modifiziertes Trypsin ausreichend, um eine hydrolytische Spaltung zu zeigen. Bei der Menge von 10 ng Trypsin waren alle Banden des Hornerins verschwunden. Der Unterschied zu der in

Abb. 35C zeigten tryptischen Empfindlichkeit liegt in der Verwendung eines anderen Proteins (rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ versus rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄), einer anderen Proteinmenge (10 µg versus 1 µg) eines anderen Trypsins (Trypsin versus modifiziertes Trypsin: mod. Trypsin ist durch Methylierung vor dem Selbstverdau geschützt), einer längeren Inkubationsdauer (16 h versus 1 h) und eines anderen Nachweissystems (Western-Blot-Analyse versus Silberfärbung).

Obwohl im BSA über 100 und im Cytochrom C 35 hypothetische Schnittstellen zu finden sind, während das hier verwendete Hornerinfragment (rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄) nur 4 hypothetische Schnittstellen für Thermolysin aufweist, wurden bei Verwendung von 100 ng Thermolysin die beiden Proteine unter den gewählten Bedingungen nur minimal verdaut (leichte Abschwächung der Bandenintensität), wohingegen beim Hornerin nach Behandlung mit 10 ng mehrere Banden auftreten, was auf eine Fragmentierung deutete. Mit 100 ng Thermolysin wurde für das verwendete Hornerinfragment keine Bande mehr erkannt (Abb. 36B).

Für Lys-C sind im BSA 59, im Cytochrom C 18 hypothetische Schnittstellen vorhanden, wohingegen im hier verwendeten Hornerinfragment (rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄) keine Schnittstelle vorhanden ist. Unter den gewählten Bedingungen des Verdaus konnte für BSA keine Veränderung nachgewiesen werden, während im Cytochrom C mit 10 ng Lys-C bereits ein nahezu vollständiges Verschwinden der Proteinbande zu beobachten war. Auf das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ hatte der proteolytische Verdau über eine Stunde mit Lys-C - im Gegensatz zu der Inkubation von rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ über 18 h (Abb. 35E) - keinen Einfluss (Abb. 36C).

Eine Kollagenaseschnittstelle lässt sich in keinem der drei verwendeten Proteine vorhersagen. Trotzdem wurde durch 100 ng Kollagenase unter den Versuchsbedingungen rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ geschnitten (Abb. 36D).

Proteinase K schneidet hinter aliphatischen, aromatischen und anderen hydrophoben Aminosäuren. Somit sind im BSA fast 300, im Cytochrom C 47 und im rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ 4 hypothetische Schnittstellen zu finden. Bei BSA zeigten sich mit 1 ng Proteinase K erste Veränderungen, wobei auch mit 100 ng Proteinase K die Banden nicht vollständig verschwanden. Beim Verdau von Cytochrom C konnte mit 100 ng Proteinase K eine zusätzliche Bande bei 10 kDa beobachtet werden. Beim Hornerin waren 10 ng ausreichend, um die Bande vollständig verschwinden zu lassen. Ebenso wurde bei Zugabe von 1 ng schon eine ausgeprägte Abschwächung der Bande erkennbar. Interessanterweise konnte keine Bande für eines der 5 hypothetischen Fragmente detektiert werden (Abb. 36E).

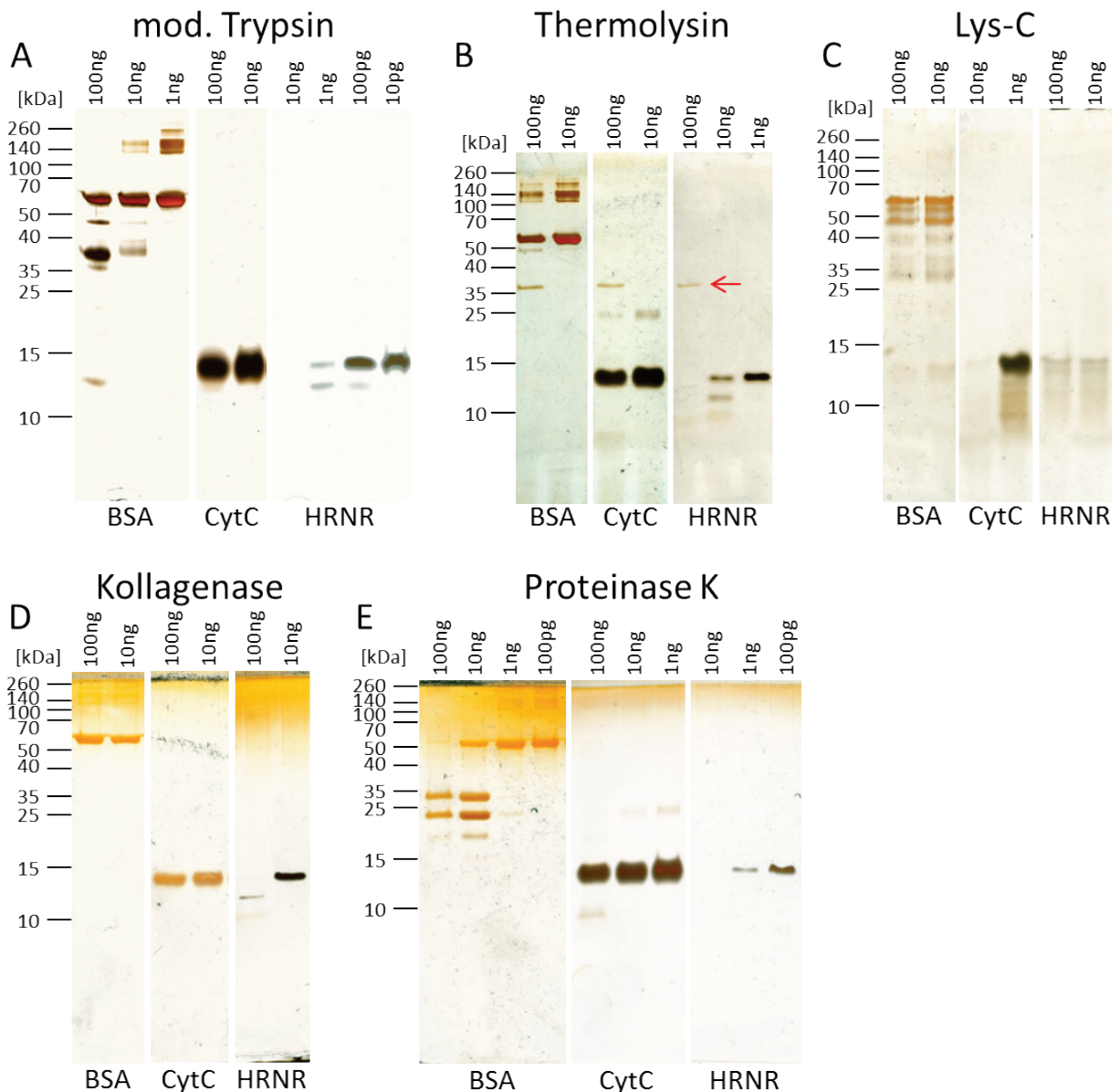


Abb. 36: Proteolyseempfindlichkeit von rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im Vergleich mit BSA und Cytochrom C. 1 µg BSA, Cytochrom C oder rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ wurden mit einer dekadischen Verdünnung zwischen 100 ng und 100 fg der entsprechenden Protease bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Ansätze wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein per Silberfärbung nachgewiesen. **(A)** modifiziertes Trypsin, **(B)** Thermolysin (der rote Pfeil markiert die Bande des Thermolysins), **(C)** Kollagenase, **(D)** Proteinase K und **(E)** modifiziertes Trypsin.

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, ob in der Haut vorkommende Proteasen in der Lage sind rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ zu verdauen. Dazu wurden diverse Kallikreine KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK7, KLK8, KLK13, KLK14, Trypsin, α-Chymotrypsin, Elastase, Plasmin, Thrombin, sowie die bakterielle Protease Lys-C mit rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ inkubiert und eine Proteolyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse ausgewertet (Abb. 37).

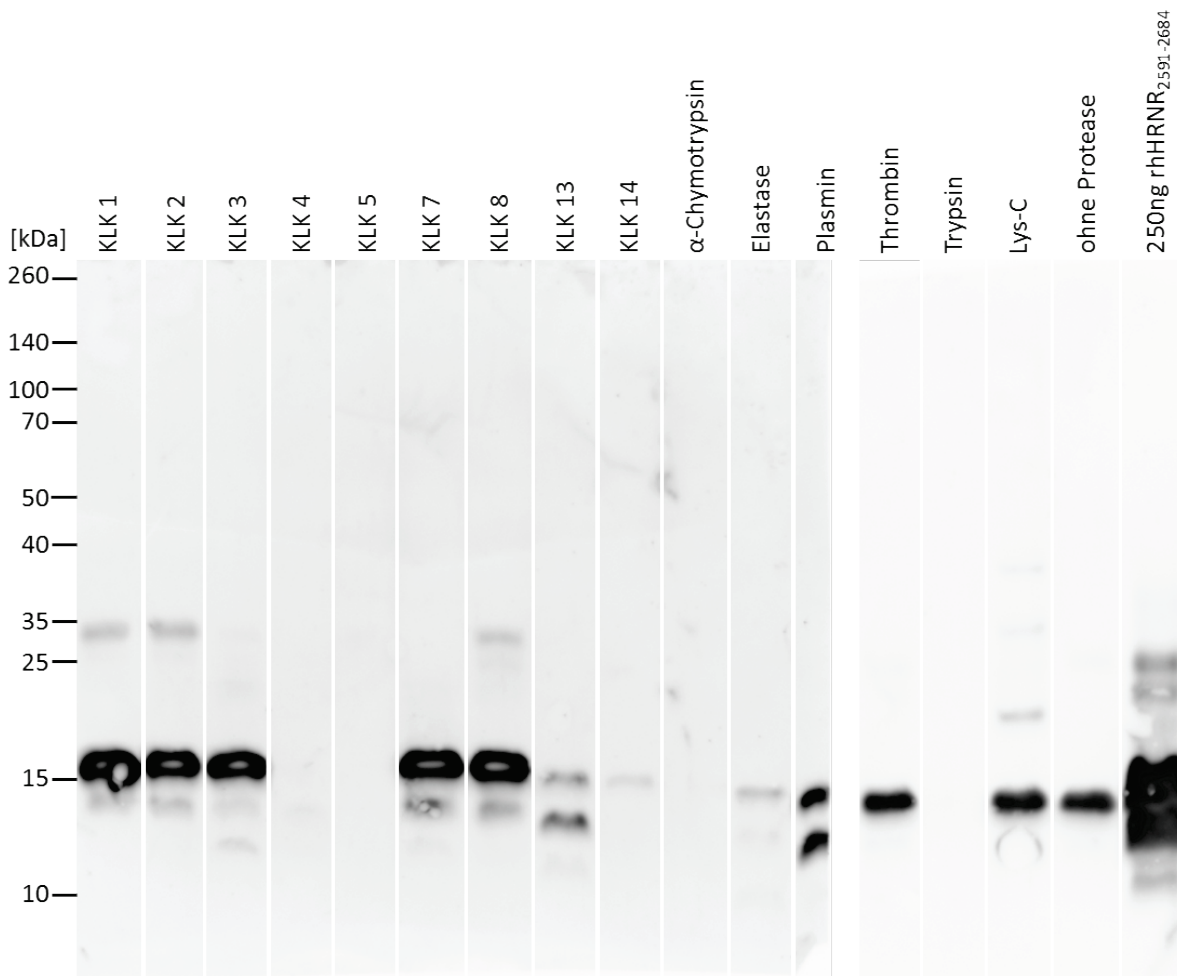


Abb. 37: Proteolyse von rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ durch humane Proteasen. Je 500 ng rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ wurden mit 0,7 nM der entsprechenden Protease in Puffer (100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween 20) über 15 h inkubiert. Die Aktivität der Proteasen (mit Ausnahme von Trypsin und Lys-C) wurde anhand eines Fluoreszenzsubstrats überprüft. Für eine SDS-PAGE-Analyse wurden 250 ng des Proteins verwendet und per Western-Blot analysiert. Die erste Kontrollspur enthält rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄, das ohne Protease über 15 h inkubiert wurde, die zweite Kontrollspur enthält 250 ng bei 4°C in 0,01 % Essigsäure gelagertes rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄.

Für die Proteasen KLK4, KLK5, KLK13, KLK14, α-Chymotrypsin, Elastase, Plasmin und Trypsin konnte proteolytische Aktivität beobachtet werden. Die anderen untersuchten Proteasen zeigten unter den gewählten Versuchsbedingungen (100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween 20) keine Aktivität. Bei KLK3 und Lys-C konnten zusätzliche Banden detektiert werden, ohne dass sich die 16 kDa-Hauptbande des Hornerinfragments in ihrer Intensität veränderte. Die Ursache für die Doppelbande und die hohe Signalintensität im Vergleich zwischen den 250 ng rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ und den unter den gleichen Versuchsbedingungen inkubierten 250 ng rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ ist unklar.

Wurde das Hornerin vorab mit der in der Epidermis vorkommenden Protein-Arginin Deiminase 1 (PAD1) inkubiert, so zeigte das citrullinierte Protein bei einigen Proteasen eine veränderte Empfindlichkeit (Abb. 38). Das citrullinierte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ zeigte trotz einer

nahezu unveränderten Masse (+9 Da) ein stark verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE. Das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ wies eine Doppelbande bei 15 und 17 kDa auf, während das citrullinierte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ etwas oberhalb von 40 kDa detektiert werden konnte.

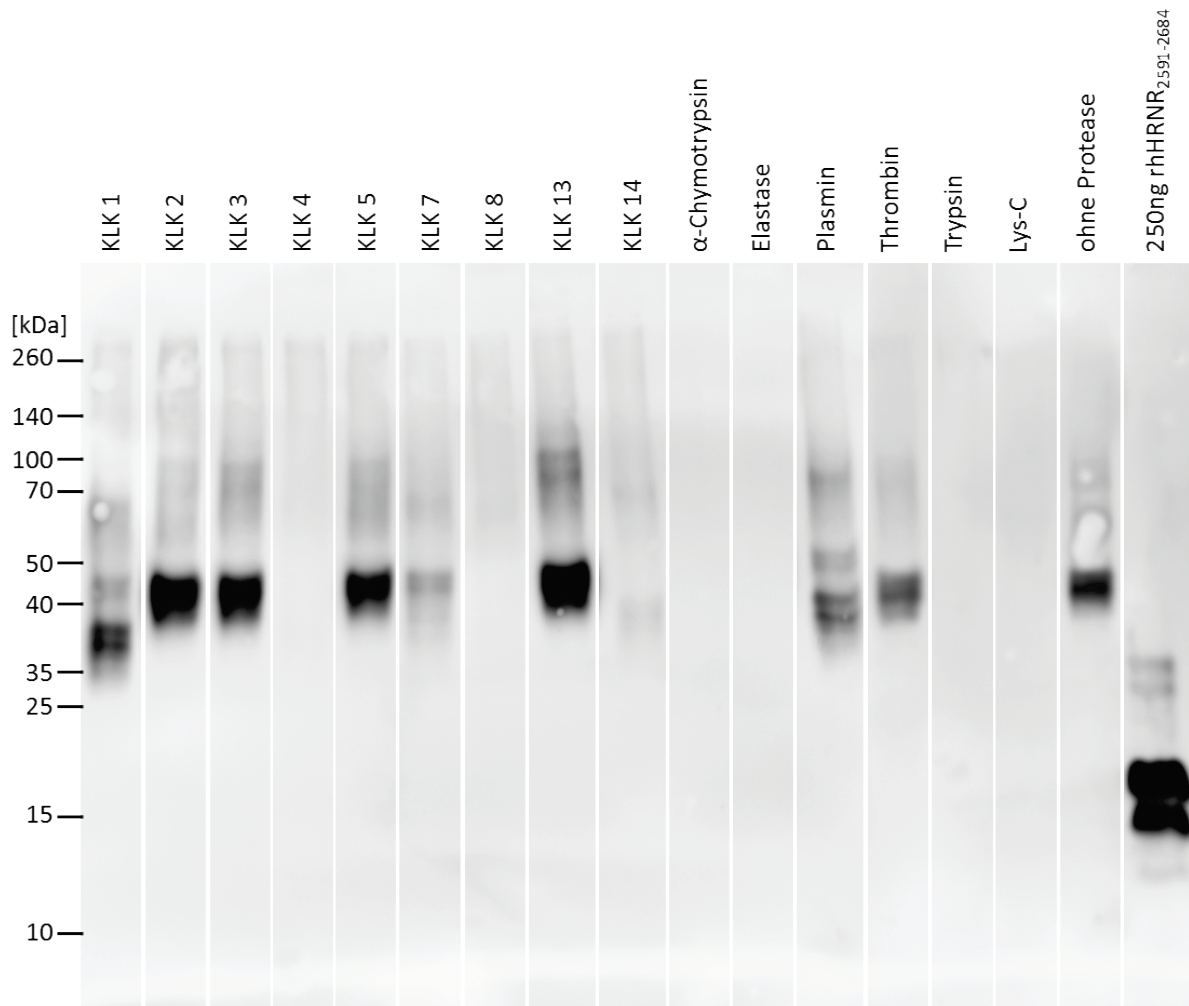


Abb. 38: Proteolyse von PAD1-citrulliniertem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ durch humane Proteasen. 500 ng mit PAD1 citrulliniertes rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ wurden mit 0,7 nM der entsprechenden Protease in Puffer (100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 Tween 20) über 15 h inkubiert. Die Aktivität der Proteasen (mit Ausnahme von Trypsin und Lys-C) wurde anhand eines Fluoreszenzsubstrats überprüft. In der SDS-PAGE wurden 250 ng des Proteins aufgetragen und per Western-Blot analysiert. Die erste Kontrollspur enthält 250 ng mit PAD1 citrulliniertes rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄, das ohne Protease über 15 h inkubiert wurde, die zweite Kontrollspur enthält 250 ng bei 4°C in 0,01 % Essigsäure gelagertes rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄.

Für die Proteasen KLK4, KLK8, KLK14, α-Chymotrypsin, Elastase, und Trypsin konnte eine hohe und für KLK1, KLK7, Plasmin, Thrombin und Lys-C konnte eine schwache proteolytische Aktivität beobachtet werden. Die anderen untersuchten Proteasen zeigten unter den gewählten Versuchsbedingungen (100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween 20) keine Aktivität.

Deutlich ist der Einfluss der Citrullinierung des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ auf die Proteolyse-empfindlichkeit gegenüber einigen Proteasen zu erkennen. Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen

Empfindlichkeiten ist noch einmal in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 6) dargestellt. Besonders deutliche Unterschiede sind für das sogenannte Stratum corneum tryptische Enzym (SCTE) KLK5, das sogenannte Stratum corneum chymotryptische Enzym (SCCE) KLK7, sowie KLK8 und die bakterielle Protease Lys-C zu erkennen.

Tab. 6: Einfluss der Citrullinierung des Hornerins auf die Proteolyseempfindlichkeit. Dargestellt sind die Empfindlichkeiten der beiden Substrate rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ und citrulliniertem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ gegenüber den verschiedenen Proteasen. Keine Empfindlichkeit ist mit einem „-“ gekennzeichnet, leichte Veränderungen in Form zusätzlicher Banden mit „+/-“, deutliche Veränderungen sind mit „+“ und ein vollständiger Verdau mit „++“ bezeichnet. Die Proteasen die Veränderungen zwischen den beiden Substraten zeigen sind fett markiert.

| | KLK1 | KLK2 | KLK3 | KLK4 | KLK5 | KLK7 | KLK8 | KLK13 | KLK14 | α -Chymotrypsin | Elastase | Plasmin | Thrombin | Trypsin | Lys-C |
|--|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------------------------|----------|---------|----------|---------|-------|
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ | - | - | +/- | ++ | ++ | - | - | + | ++ | ++ | ++ | + | - | ++ | +/- |
| citrulliniertes rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ | + | - | - | ++ | - | + | ++ | - | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ |

5.11 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität verschiedener Hornerinfragmente

Die im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellten Hornerinfragmente wurden in zwei unterschiedlichen Testsystemen untersucht. Initial erfolgte die Untersuchung im Radialdiffusionstest (RDA), bei dem der Hemmhofdurchmesser und die Eigenschaften des Hemmhofes untersucht wurden. Anschließend erfolgten Untersuchungen im Mikroverdünnungstest-System (MDA) bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen. In diesem Testsystem wurde die letale Dosis mit mindestens 90 % Abtötung (LD₉₀) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK; 99.99 % Abtötung) bestimmt. Dargestellt werden die Ergebnisse aus dem MDA als Dosis-Wirkungs-Kurven um auch Besonderheiten in der antimikrobiellen Aktivität der Substanzen darstellen zu können. Diese Besonderheiten können durch die beiden Zahlenwerte der LD₉₀ und der MBK nicht ausreichend abgebildet werden.

Zu Beginn wurden Fragmente aus verschiedenen Bereichen des Hornerinproteins getestet. So wurde das Amino-terminale Fragment rHRNR₁₋₁₀₂, das die S100-Domäne beinhaltet, als pET-SUMO-Fusionsprotein untersucht. Dieses Protein konnte aufgrund eines Prolins an Position 2 der HRNR-Sequenz mit der SUMOprotease nicht geschnitten werden. Des Weiteren wurden

das Carboxy-terminale Fragment rHRNR₂₇₂₇₋₂₈₅₀ sowie das Fragment rHRNR₁₀₇₅₋₁₁₇₂ und die beiden Fragmente rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ und rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ aus dem Bereich der Sequenzwiederholungen auf ihre antimikrobielle Aktivität analysiert. Die Ergebnisse aus dem RDA (Tab. 7) zeigten eine Aktivität der Fragmente aus dem Bereich der Sequenzwiederholungen und aus dem Carboxy-Terminus gegen *E. coli* und *P. aeruginosa*. Das Amino-terminale Fragment zeigte gegen keines der drei Bakterien oder *C. albicans* eine Aktivität. Für rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ konnte eine schwache Aktivität gegen *C. albicans* detektiert werden. Diese Aktivität war in der Potenz mit der von 500 ng Lysozym vergleichbar, allerdings ergab sich eine geringere Effizienz, da noch ein geringes Wachstum im Hemmhof zu erkennen war.

Tab. 7: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität verschiedener Hornerinfragmente im RDA. Ergebnisse aus der Testung in der Radialdiffusion. Eingesetzt wurden 5 µl der Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 µg/µl in 0,01% Essigsäure bei einem pH-Wert von 7,3 und der Verwendung von 1 % TSB im „Underlay“. kH = keine Hemmung; HHHH = abgegrenzter Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof; HHH = Hemmhof nicht messbar; HH = abgegrenzter Hemmhof, geringes Wachstum im Hemmhof; der Zahlenwert gibt den Durchmesser des Hemmhofes an (Mittelwert aus Triplikaten), das 3 mm Stanzloch, in das die Proteinlösung eingefüllt wurde, wurde vom Hemmhofdurchmesser nicht subtrahiert. Als Kontrollsubstanz wurden 5µl einer Lysozymlösung in 0,01% Essigsäure mit einer Konzentration von 0,1 µg/µl eingesetzt. Die Hemmhöfe für die Lysozymkontrolle waren immer klar, deshalb wird hier nur der Durchmesser angegeben.

| | <i>E. coli</i> ATCC 11775 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | <i>C. albicans</i> ATCC 24433 |
|---|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| rHRNR ₁₋₁₀₂ pET-SUMO Fusionsprotein | kH | kH | kH | kH |
| rHRNR ₁₀₇₅₋₁₁₇₂ | HHH | HHH | kH | kH |
| rHRNR ₂₅₇₆₋₂₇₀₇ | HHHH 6,8 | HHHH 5,8 | kH | kH |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ | HHHH 11,2 | HHHH 7,2 | kH | HH 6,0 |
| rHRNR ₂₇₂₇₋₂₈₅₀ | HHHH 6,8 | HHHH 6,2 | kH | kH |
| Lysozym | 6,1 | 5,2 | 6,0 | 6,5 |

Alle Fragmente wurden daraufhin im MDA (Abb. 39) gegen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ATCC 12600 und *C. albicans* untersucht. Für zwei Fragmente (rHRNR₁₀₇₅₋₁₁₇₂ und rHRNR₂₇₂₇₋₂₈₅₀), die im RDA eine Aktivität zeigten, ließ sich im MDA unter den gewählten Testbedingungen keine Aktivität nachweisen. Für rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ konnte eine antimikrobielle Aktivität gegen *P. aeruginosa* mit einer LD₉₀ von 0,48 µM (6,25 µg/mL) und gegen *E. coli* mit einer LD₉₀ von 0,24 µM (3,13 µg/mL) festgestellt werden. Allerdings war dieses Protein auch in der höchsten Konzentration nicht in der Lage, alle Bakterien abzutöten. Das Ergebnis für

rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ zeigte bei *E. coli* eine LD₉₀ von 0,34 µM (3,13 µg/ml) und eine MBK von 10,86 µM (100 µg/ml). Für *P. aeruginosa* konnte eine LD₉₀ von 0,68 µM (6,25 µg/ml) und bei *C. albicans* eine LD₉₀ von 2,7 µM (25 µg/mL) ermittelt werden. Allerdings war dieses Protein auch in der höchsten Konzentration nicht in der Lage, alle *E. coli* oder *C. albicans* Zellen abzutöten.

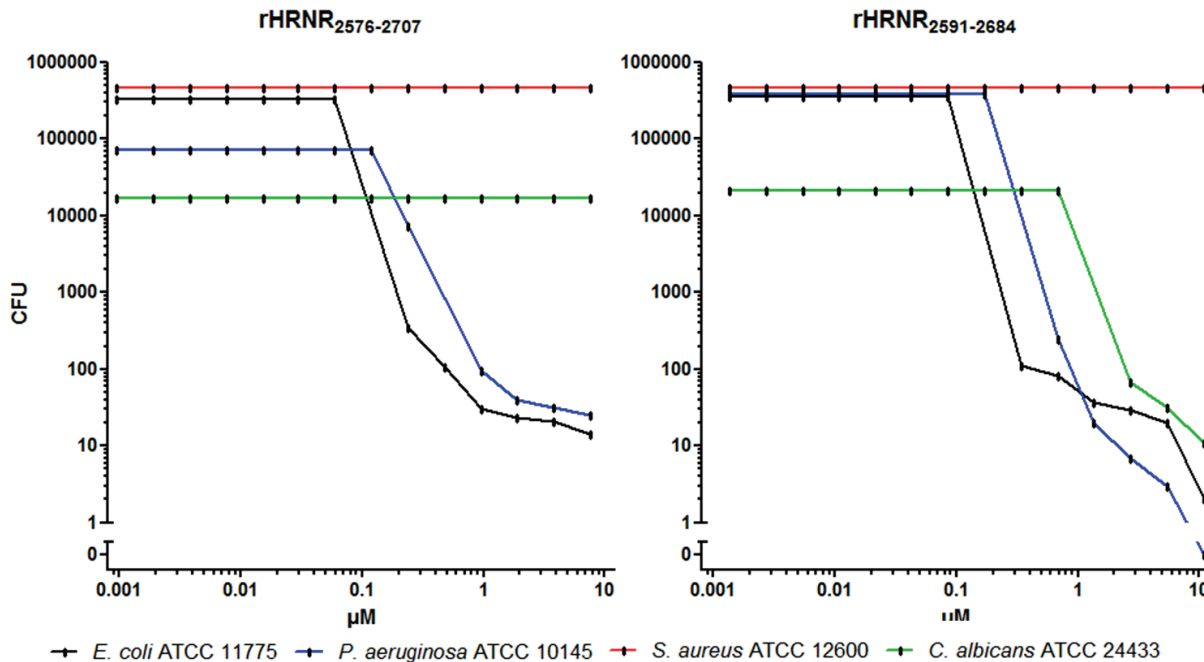


Abb. 39: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität von rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ und rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im MDA. Eingesetzt wurden die Proteine mit einer initialen Konzentration von 7,6 µM für das rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ und 10,9 µM für das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ bei pH 7,3 und der Verwendung von 1 % TSB. Jeder vertikale Strich entspricht einem Messwert einer Verdünnungsstufe. Ist der Abstand zwischen den Strichen nicht äquidistant, so waren die CFUs nicht auszählbar und es wurde kein Messwert eingetragen. Dieses ist dann der Fall, wenn die CFUs nicht mehr voneinander abgegrenzt sind, visuell aber weniger CFUs als in der Kontrolle vorhanden waren.

5.11.1 Einfluss der Tyrosine und des Leucins auf die antimikrobielle Aktivität des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄

Basierend auf dem Glycinloop-Modell von Steinert (Steinert et al., 1991) (Abschnitt 5.10.1) wurde die Notwendigkeit der aromatischen und langkettig aliphatischen Aminosäuren für die antimikrobielle Aktivität überprüft. Dazu wurden die drei Tyrosine und das Leucin im rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ sequenziell in Glycine mutiert (Tab. 12 im Anhang). Die mutierten Hornerine zeigten eine im Vergleich mit dem Ausgangsprotein geringfügig reduzierte antimikrobielle Aktivität. So konnte im RDA ein Fehlen der Aktivität gegen *C. albicans* und eine leichte Reduktion der Aktivität gegen *E. coli* beobachtet werden, die Aktivität gegen *P. aeruginosa* wurde hingegen nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden im MDA verifiziert (Abb. 40). Das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ ohne aromatische und langkettig aliphatische

Aminosäuren zeigt für *P. aeruginosa* im Vergleich mit dem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄, dass auch in der höchsten Konzentration kein vollständiges Abtöten der Bakterien mehr möglich war. Für *E. coli* und *C. albicans* wurde in den höchsten Dosen eine unveränderte Aktivität detektiert bei der zwischen 100 und 300 Bakterienzellen überlebten.

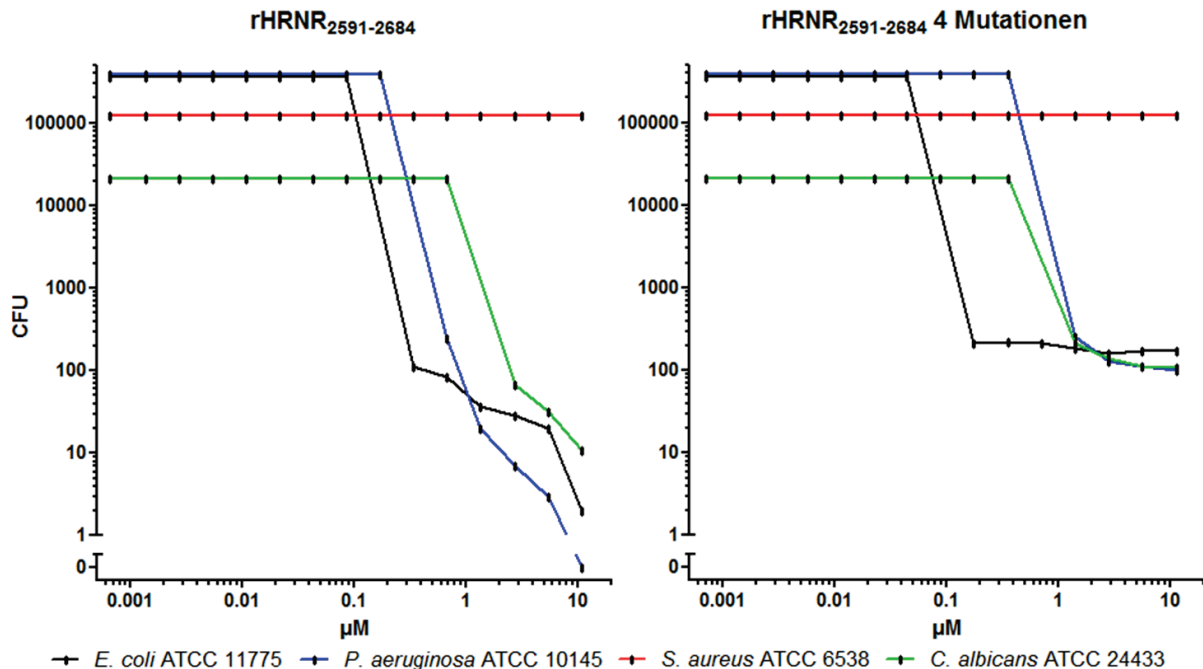


Abb. 40: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität von mutiertem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im Vergleich zu rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im MDA. Eingesetzt wurden die Proteine mit einer initialen Konzentration von 10,9 µM für das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ und 11,3 µM für das die 4 Mutationen enthaltende rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ bei pH 7,3 und der Verwendung von 1 % TSB. Jeder vertikale Strich entspricht einem Messwert einer Verdünnungsstufe. Ist der Abstand zwischen den Strichen nicht äquidistant, so waren die CFUs nicht auszählbar und es wurde kein Messwert eingetragen. Dieses ist dann der Fall, wenn die CFUs nicht mehr voneinander abgegrenzt sind, visuell aber weniger CFUs als in der Kontrolle vorhanden waren.

5.11.2 Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von den Argininen im rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄

Die Überprüfung der Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von den 9 Argininen im rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ erfolgte durch enzymatische Behandlung des Proteins mit Protein-Arginin Deiminase 1 (PAD1), die eine Umsetzung von Arginin in Citrullin katalysiert. Zusätzlich zu dem blutphysiologischen pH-Wert von 7,3 erfolgte im RDA auch eine Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität bei dem für die Haut physiologischen pH-Wert von 5,5. Der MDA wurde nur beim pH-Wert von 5,5 durchgeführt. Außerdem konnte zwischenzeitlich die Nährstoffquelle als Einflußgröße auf die antimikrobielle Aktivität ausgemacht werden, so dass bei diesem MDA statt der sonst verwendeten 1 % TSB 0,25 % (13,88 mM) Glukose verwendet wurden. Auf den Einfluß der Versuchsbedingungen auf die antimikrobielle Aktivität wird im Abschnitt 5.11.4 noch einmal genauer eingegangen. Die Überprüfung erfolgte für das

rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄pSUMO3-Fusionsprotein und das PAD1-behandelte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsprotein im RDA (Tab. 8) und für rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ und citrulliniertes rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im MDA (Abb. 41). Aufgrund der Verfügbarkeit des Proteins wurde für den RDA das Fusionsprotein und für den MDA das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ verwendet. Für den Fusions-„Tag“ konnte im RDA keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden.

Im RDA (Tab. 8) war für beide pH-Werte und auch für beide Bakterienstämme ein kompletter Verlust der antimikrobiellen Aktivität für das PAD1-behandelte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsprotein zu beobachten. Zusätzlich traten sogenannte Zonenphänomene auf. Hierbei kommt es in bestimmten Abständen vom Stanzloch zu einer verstärkten und/ oder einer reduzierten Trübung, die dann mit dem Bakterienwachstum assoziiert wird. Dieses Phänomen tritt allerdings sowohl bei dem Protein mit den Citrullinen als auch bei dem Protein mit den Argininen auf und trat auch zusätzlich zu einem klaren Hemmhof auf.

Tab. 8: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von citrulliniertem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsprotein im RDA. Ergebnisse aus der Testung in der Radialdiffusion. Eingesetzt wurden 5 µl der Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 µg/µL in 0,01% Essigsäure bei pH 7,3 und pH 5,5 und der Verwendung von 1 % TSB im „Underlay“. - = kein Test durchgeführt; kH = keine Hemmung, HHHH = abgegrenzter Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof, Zp = Zonenphänomen (mögliche Zonen mit Wachstumsverstärkung, aber auch Abschwächung oder vollständiger Inhibition des Wachstums); der Zahlenwert gibt den Durchmesser des Hemmhofes an (Mittelwert aus Triplikaten), das 3 mm Stanzloch, in das die Proteinlösung eingefüllt wurde, wurde vom Hemmhofdurchmesser nicht subtrahiert. Als Kontrollsubstanzen wurden bei pH 7,3 5 µl einer Lysozymlösung in 0,01 % Essigsäure mit einer Konzentration von 0,1 µg/µL eingesetzt und bei pH 5,5 5 µl einer Chlorhexidinlösung in 0,05% Essigsäure mit einer Konzentration von 0,031 µg/µl. Die Hemmhöfe der Kontrollsubstanzen waren immer klar, deshalb wird hier nur der Durchmesser angegeben.

| | <i>E. coli</i> ATCC 11303 | | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 | |
|---|------------------------------|--------------|------------------------------------|-------------|
| | pH 7,3 | pH 5,5 | pH 7,3 | pH 5,5 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ -pSUMO3-Fusionsprotein | HHHH 8,0 (Zp) | HHHH 14,0 | HHHH 5,0 | HHHH 7,2 |
| citrulliniertes rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ -pSUMO3-Fusionsprotein | kH | Zp | kH | kH |
| Lysozym | 7,0 | - | 5,5 | - |
| Chlorhexidin | - | 15,0 | - | 5,6 |

Im MDA (Abb. 41) kam es im Gegensatz zum RDA, bei dem allerdings auch das Fusionsprotein verwendet wurde, nur zu einer Verringerung der antimikrobiellen Aktivität des PAD1-behandelten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄. Bei *E. coli* zeigte sich beim rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ unter diesen Versuchsbedingungen ein paradoxer Effekt (Eagle und Musselman, 1948; Holm et al., 1990),

bei dem die Anzahl der abgetöteten Bakterien mit steigender Konzentration des Proteins wieder abnimmt. Für das citrullinierte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ konnte bei *E. coli* keine antimikrobielle Wirkung detektiert werden. Bei *C. albicans* war eine 100%ige Abtötung nicht mehr möglich. Bei *P. aeruginosa* war die notwendige Proteinkonzentration, um ein 100%iges Abtöten zu erreichen, beim citrullinierten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ 16-fach erhöht. Bei *S. aureus* war der Einfluß des citrullinierten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ auf die Anzahl der Bakterien bei niedrigen Konzentrationen weniger ausgeprägt als für das Arginin enthaltende rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄.

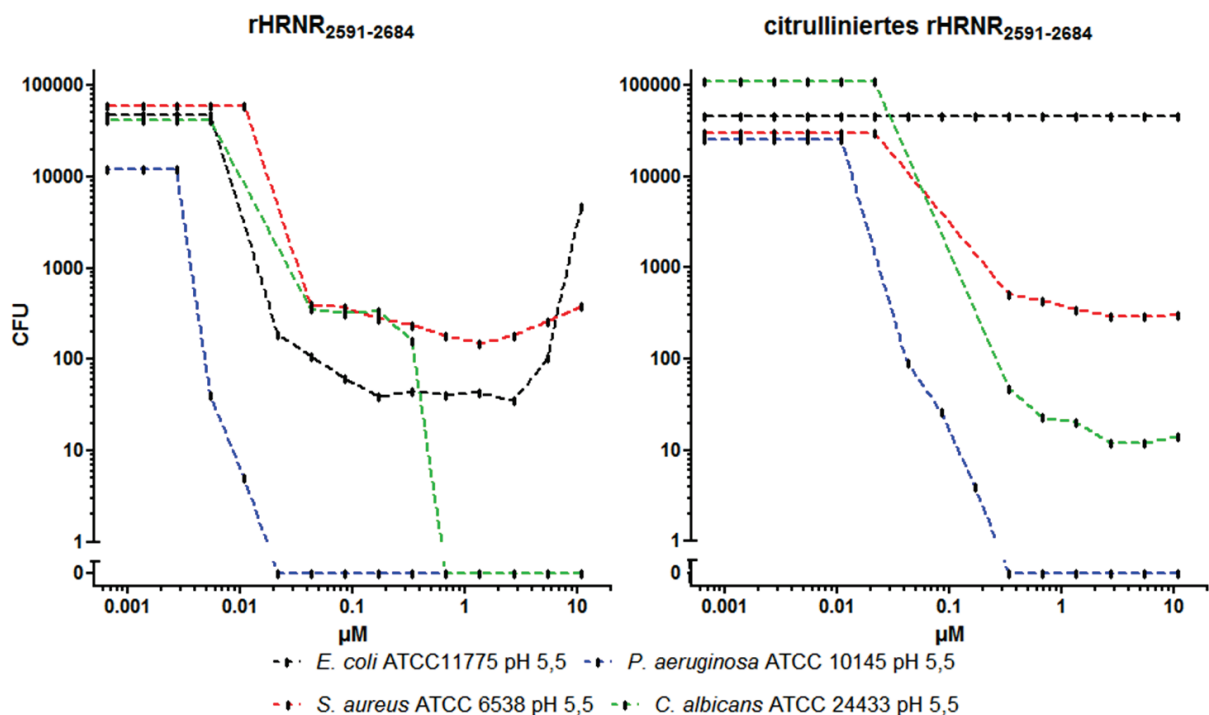


Abb. 41: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität von rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ und citrulliniertem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im MDA. Eingesetzt wurden die Proteine mit einer initialen Konzentration von 10,9 µM für das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ und 10,8 µM für das citrullinierte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ bei pH 5,5 und 0,25 % Glukose (13,88 mM). Jeder vertikale Strich entspricht einem Messwert einer Verdünnungsstufe. Ist der Abstand zwischen den Strichen nicht äquidistant, so waren die CFUs nicht auszählbar und es wurde kein Messwert eingetragen. Dieses ist dann der Fall, wenn die CFUs nicht mehr voneinander abgegrenzt sind, visuell aber weniger CFUs als in der Kontrolle vorhanden waren.

5.11.3 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität kürzerer Hornerinfragmente

Welche Fragmentslänge ist notwendig, um eine antimikrobielle Aktivität zu erhalten? Diese Frage wurde durch die antimikrobielle Testung von sechs rekombinanten Proteinen bzw. Peptiden aus dem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ untersucht. Die Fragmente wurden anhand der hypothetischen Schnittstellen des Trypsins innerhalb dieses Fragments ausgewählt (Tab. 12 im Anhang). Die Fragmente wurden zuerst im RDA (Tab. 9) analysiert und die in diesem Test aktiven Fragmente anschließend im MDA (Abb. 42) untersucht.

Im RDA konnte für die beiden Amino-terminalen Fragmente rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₀₉ und rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₁₈ keine antimikrobielle Aktivität detektiert werden. Das kürzere Fragment wurde nur bei einem pH von 7,3 getestet, da schon das längere Fragment bei pH 5,0 keine antimikrobielle Aktivität zeigte. Für das um 40 Aminosäuren Carboxy-terminal verkürzte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₄₄, das aufgrund von Problemen mit dem proteolytischen Verdau als pESumo3-Fusionsprotein eingesetzt wurde, konnte gegen alle Mikroorganismen eine Aktivität detektiert werden. Bei pH 7,3 war konzentrationsabhängig an allen Stanzlöchern ein weißer Ring zu sehen. Zu vermuten ist, dass es sich dabei um präzipitiertes Protein handelt, das nicht in den „Underlay“ diffundiert war. Bei pH 5,0 zeigte *E. coli* einen Hemmhof mit diesem Peptid, der mit dem des Chlorhexidins als Positiv-Kontrolle vergleichbar ist. Für die drei Fragmente rHRNR₂₆₃₈₋₂₆₈₄, rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ und rHRNR₂₆₅₈₋₂₆₈₄ konnte eine antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* sowie für das rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ auch gegen *P. aeruginosa* detektiert werden.

Tab. 9: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von verschiedenen rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-Fragmenten im RDA.

Ergebnisse aus der Testung in der Radialdiffusion. Eingesetzt wurden 5 µl der Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 µg/µL in 0,01% Essigsäure (mit Ausnahme des pESUMO3-Fusionsproteins, dieses wurde mit 5,25 µg/µL eingesetzt um auf molarer Ebene den Fusions-„Tag“ auszugleichen). Die Testung erfolgte bei pH 7,3 und 5,0 in Gegenwart von 1 % TSB im „Underlay“. - = kein Test durchgeführt; e.W. = erhöhtes Wachstum in direkter Umgebung des Stanzloches, kH = keine Hemmung, w.R. = weißer Ring am Stanzloch, HHHH = abgegrenzter Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof, HHH = abgegrenzter Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof aber Hemmhof nicht messbar, HH = abgegrenzter Hemmhof, geringes Wachstum im Hemmhof, H = abgegrenzter Hemmhof, deutliches Wachstum im Hemmhof, (H) = nicht abgegrenzter Hemmhof, deutliches Wachstum im Hemmhof, aber Hemmhof nicht messbar. Der Zahlenwert gibt den Durchmesser des Hemmhofes in mm an (Mittelwert aus Triplikaten), das 3 mm Stanzloch, in das die Proteinlösung eingefüllt wurde, wurde vom Hemmhofdurchmesser nicht subtrahiert. Als Kontrollsubstanzen wurden bei pH 7,3 5 µl einer Lysozymlösung in 0,01 % Essigsäure mit einer Konzentration von 0,1 µg/µL eingesetzt und bei pH 5,5 5 µl einer Chlorhexidinlösung in 0,05% Essigsäure mit einer Konzentration von 0,031 µg/µl. Die Hemmhöfe der Kontrollsubstanzen waren immer klar, deshalb wird hier nur der Durchmesser angegeben.

| | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 | | <i>C. albicans</i> ATCC 24433 | | <i>E. coli</i> ATCC 11775 | |
|--|-------------------------------|------------------|------------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------|------------------------------|--------------|
| | pH 7,3 | pH 5,0 | pH 7,3 | pH 5,0 | pH 7,3 | pH 5,0 | pH 7,3 | pH 5,0 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₀₉ | e.W. | - | kH | - | kH | - | kH | - |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₁₈ | e.W. | e.W. | kH | kH | kH | kH | kH | kH |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₄₄ -pESumo3-Fusionsprotein | HH 4,5 w.R. | H 6,5 e.W. | HH 5,0 w.R. | HHHH 6,5 | kH w.R. | HHHH 8,5 | HHHH 6,5 w.R. | HHHH 11,0 |
| rHRNR ₂₆₃₈₋₂₆₈₄ | kH | - | kH | kH | kH | kH | HH 6,3 | (H) |
| rHRNR ₂₆₅₆₋₂₆₈₄ | kH | e.W. | HHH | kH | kH | HHH | HHHH 6,0 | HHHH 6,5 |
| rHRNR ₂₆₅₈₋₂₆₈₄ | kH | e.W. | kH | kH | kH | kH | kH | HH 5,0 |
| Lysozym | 6,1 | - | 5,1 | - | 6,4 | - | 5,6 | - |
| Chlorhexidin | - | 11,7 | - | 5,1 | - | 8,4 | - | 11,4 |

Die vier Fragmente mit antimikrobieller Aktivität wurden im MDA bei pH 7,2 und pH 5,0 untersucht. Gegen *S. aureus* war nur das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₄₄-pESumo3-Fusionsprotein in den beiden höchsten Konzentrationen bei pH 7,2 antimikrobiell aktiv. Gegen *P. aeruginosa* konnte bei pH 7,2 für rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₄₄-pESumo3-Fusionsprotein und für rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ eine Aktivität gefunden werden. Diese war allerdings nur in den 4 bzw. 3 höchsten Konzentrationen detektierbar und führte nur zu einer Reduktion der Bakterienzahl aber nicht zu einer vollständigen Abtötung.

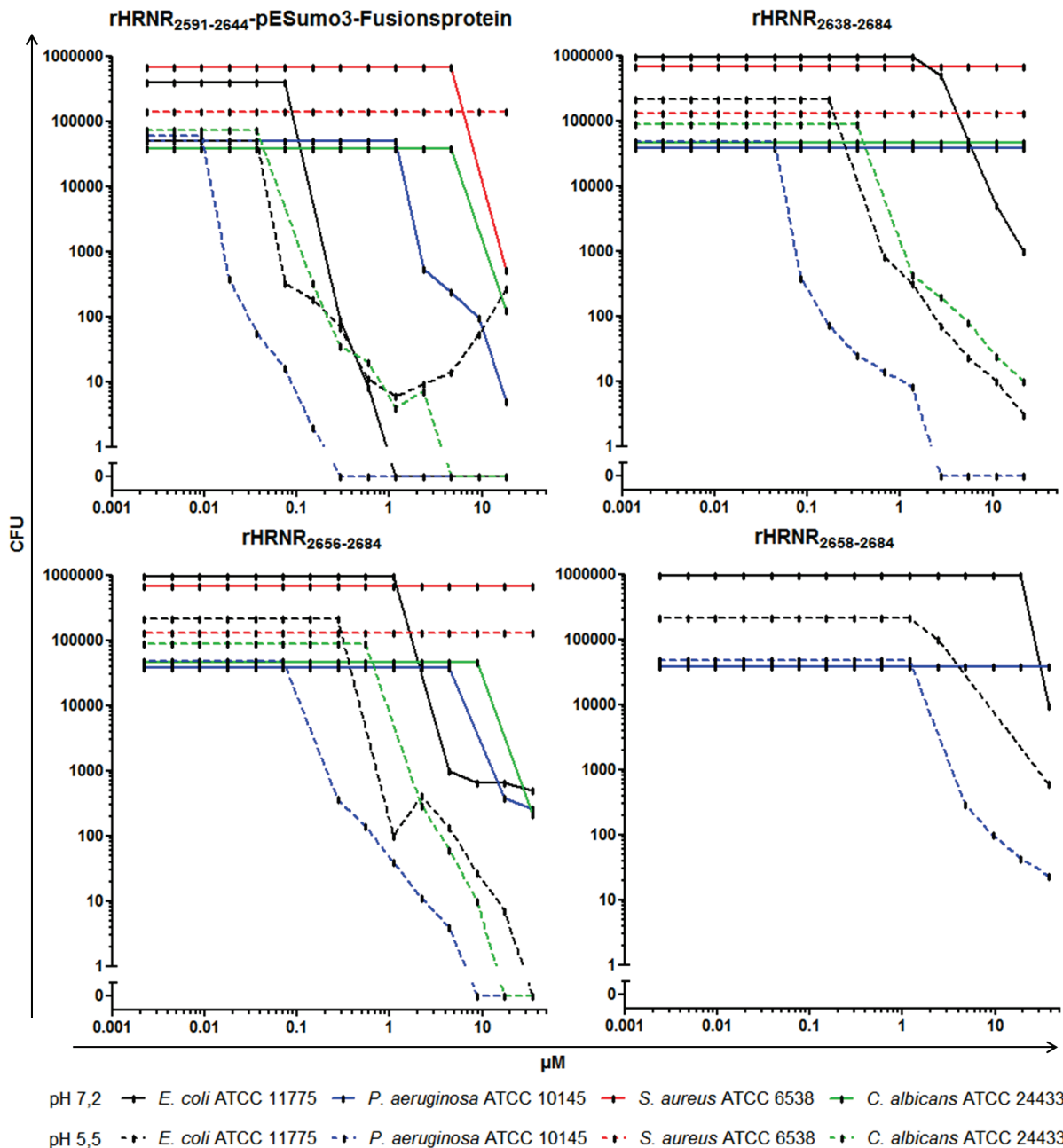


Abb. 42: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität von verschiedenen rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ Fragmenten im MDA. Eingesetzt wurden die Proteine mit einer initialen Konzentration von 18,6 μM für rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pESumo3-Fusionsprotein, 21,9 μM für rHRNR₂₆₃₈₋₂₆₈₄, 35,3 μM für rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ und 38,2 μM für rHRNR₂₆₅₈₋₂₆₈₄. Die Testung erfolgte bei pH 7,3 und 5,5 in Gegenwart von 1 % TSB. Jeder vertikale Strich entspricht einem Messwert einer Verdünnungsstufe. Ist der Abstand zwischen den Strichen nicht äquidistant, so waren die CFUs nicht auszählbar und es wurde kein Messwert eingetragen. Dieses ist dann der Fall, wenn die CFUs nicht mehr voneinander abgegrenzt sind, visuell aber weniger CFUs als in der Kontrolle vorhanden waren.

Bei pH 5,5 zeigten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₄₄-pESumo3-Fusionsprotein und rHRNR₂₆₃₈₋₂₆₈₄ eine sehr gute Aktivität gegen *P. aeruginosa* mit einer MBK von 0,15 μM bzw. 2,7 μM . Die Verkürzung des rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ um die beiden Amino-terminalen Aminosäuren Glycin und Arginin führte zu einer starken Verringerung der antimikrobiellen Aktivität. Das rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ hat eine MBK von 4,4 μM und eine LD₉₀ von 0,28 μM während für das rHRNR₂₆₅₈₋₂₆₈₄ keine MBK bestimmt werden konnte und die LD₉₀ bei 4,8 μM liegt. Gegen *E. coli* konnte für das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-

pESumo3-Fusionsprotein bei einem pH-Wert von 7,3 eine MBK von 0,6 μM bestimmt werden. Bei einem pH-Wert von 5,5 zeigte sich ein paradoxer Effekt. Bei einer Konzentration von 1,2 μM wurde die Anzahl der CFUs auf 99,4 % reduziert, während bei einer Konzentration von 18,6 μM die Reduktion der CFUs überraschenderweise nur bei 94,2 % lag. Für das rHRNR₂₆₃₈₋₂₆₈₄ konnte bei einem pH-Wert von 7,3 eine Hemmung bis zu einer Konzentration von 2,7 μM detektiert werden. Bei einem pH-Wert von 5,5 wurde die erste Hemmung bereits bei 0,3 μM detektiert und die MBK dieses Peptids mit 5,5 μM bestimmt. Eine vollständige Abtötung aller Bakterien erfolgte aber auch mit der höchsten Konzentration von 21,9 μM nicht. Ein ähnliches Bild zeigte sich für das rHRNR₂₆₅₈₋₂₆₈₄. Interessanterweise zeigt das um 17 Aminosäuren kürzere rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ im Vergleich mit dem rHRNR₂₆₃₈₋₂₆₈₄ bei einem pH-Wert von 5,5 eine vollständige Abtötung bei einer Konzentration von 35,3 μM und eine MBK von 8,8 μM , während bei einem pH-Wert von 7,3 ein Plateau in diesem Konzentrationsbereich gefunden wurde. Die antimikrobielle Aktivität gegen *C. albicans* weist eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit auf. So zeigt das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₄₄-pESumo3-Fusionsprotein bei einem pH-Wert von 7,3 Aktivität bei einer Konzentration von 9,3 μM , bei einem pH-Wert von 5,5 überraschenderweise bereits bei einer Konzentration von 0,07 μM . Die MBK wird bei einer Konzentration von 1,2 μM und die vollständige Abtötung bei 4,7 μM erreicht. Auch hier zeigt sich für das rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ mit einer MBK von 8,8 μM bei einem pH-Wert von 5,5 eine höhere antimikrobielle Aktivität als für das rHRNR₂₆₃₈₋₂₆₈₄ mit einer MBK von 21,8 μM bei pH 5,5.

5.11.4 Einfluss der Versuchsbedingungen auf die antimikrobielle Aktivität

Da offensichtlich die Testbedingungen einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität haben, wurden in systematischer Weise die Testparameter variiert. Die AMP-Testung erfolgte bei den pH-Werten 7,3 und 5,0 bzw. 5,5. Der generelle Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum der Bakterien konnte anhand der Kontrollen des MDA untersucht werden. Hier wurden die CFUs vor und nach der Inkubation in dem entsprechenden Puffer bestimmt. Dabei zeigte sich bei einem pH-Wert von 7,3 eine tendenzielle Verstärkung des Wachstums von bis zu 900 % für *S. aureus* und *E. coli* und eine tendenzielle Reduktion des Wachstums für *P. aeruginosa* und *C. albicans*. Bei einem pH-Wert von 5,0 bzw. 5,5 zeigte sich eine tendenzielle Reduktion des Wachstums von bis zu 80 % für *P. aeruginosa* und *S. aureus* und eine tendenzielle Verstärkung des Wachstums für *E. coli* und *C. albicans* (Daten nicht gezeigt). Die Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität vom pH-Wert wurde schon in Tab. 8 und Tab. 9 dargestellt. Es zeigt sich, dass bei einem pH-Wert von 5,0 bzw. 5,5 die antimikrobielle Aktivität meist höher als bei

einem pH-Wert von 7,3 ist. Der Salzgehalt beeinflusst die antimikrobielle Aktivität ebenfalls. In Tab. 10 ist die Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von der NaCl-Konzentration dargestellt.

Tab. 10: Salzabhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität für rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ im RDA. Ergebnisse aus der Testung in der Radialdiffusion. Eingesetzt wurden 5 µl der Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 µg/µL in 0,01% Essigsäure. Die Testung erfolgte bei pH 7,3 und 5,0 in Gegenwart von 1 % TSB im „Underlay“. e.W. = erhöhtes Wachstum, kH = keine Hemmung, HHHH = abgegrenzter Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof, HHH = abgegrenzter Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof aber Hemmhof nicht messbar, HH = abgegrenzter Hemmhof, geringes Wachstum im Hemmhof, H = abgegrenzter Hemmhof, deutliches Wachstum im Hemmhof. Der Zahlenwert gibt den Durchmesser des Hemmhofes in mm an (Mittelwert aus Triplikaten), das 3 mm Stanzloch, in das die Proteinlösung eingefüllt wurde, wurde vom Hemmhofdurchmesser nicht subtrahiert.

| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 | | <i>C. albicans</i> ATCC 24433 | | <i>E. coli</i> ATCC 11775 | |
|----------------------------|-------------------------------|--------|------------------------------------|-------------|----------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|
| | pH 7,3 | pH 5,5 | pH 7,3 | pH 5,5 | pH 7,3 | pH 5,5 | pH 7,3 | pH 5,5 |
| 0 mM NaCl | kH | H 7 | HHHH 6,5 | HHHH 7,0 | HHH | HHHH 10,0 | HHHH 9,5 | HHHH 11,0 |
| 50 mM NaCl | kH | e.W. | HH 4,0 | HHH | kH | HHH | H 7,5 | HH 10,5 |
| 100 mM NaCl | kH | e.W. | kH | kH | kH | kH | kH | kH |

So führte die Zugabe von 50 mM NaCl zu einer Reduktion der antimikrobiellen Aktivität bei beiden pH-Werten, sowohl qualitativ als auch quantitativ. Bei *E. coli* z. B. ergab sich eine Reduktion des Hemmhofdurchmessers nur von 11 mm auf 10,5 mm. Allerdings war der Hemmhof bei der Anwesenheit von 50 mM NaCl nicht mehr klar sondern zeigte geringes Wachstum im Hemmhof. Bei *S. aureus* konnte bei Abwesenheit von NaCl ein abgegrenzter Hemmhof mit deutlichem Wachstum im Hemmhof detektiert werden, bei 50 mM NaCl zeigte sich dann aber erhöhtes Wachstum in der Umgebung des Stanzloches. Bei allen getesteten Mikroorganismen zeigte sich bei 100 mM NaCl das völlige Fehlen antimikrobieller Aktivität. Diese Konzentration liegt unterhalb der physiologischen Konzentration von Na⁺ 136-144 mM und Cl⁻ 101-111 mM im Blut. Der Einfluß anderer Salze auf die antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* wurde mit rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSumo3-Fusionsprotein untersucht. Für Kaliumchlorid, Kaliumnitrat und Ammoniumchlorid kam es bei einem pH-Wert von 7,2 mit 50 mM der entsprechenden Salze zu einer vollständigen Inhibition der antimikrobiellen Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluß der Nährstoffverfügbarkeit wurde ebenfalls untersucht. So zeigte sich im MDA mit rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsprotein (Abb. 43), dass 1 % LB- oder TSB-Vollmedium enthaltende Inkubationsmedien im Vergleich zu Puffer ohne Nährstoffzugabe oder 0,25 %

Glukose (13,88 mM) enthaltender Puffer zu einer vergleichsweise reduzierten Aktivität führten. Besonders deutlich war der Effekt bei *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* bei einem pH-Wert von 5,5 zu erkennen. Bei *S. aureus* lässt sich bei der Verwendung von 1 % LB oder TSB-Medium keine Aktivität nachweisen, bei Verwendung von 0,25 % Glukose oder dem Puffer (10 mM Natriumphosphatpuffer) konnte hingegen eine signifikante antimikrobielle Aktivität bei einer Konzentration von 0,0024 µM bzw. 0,019 µM detektiert werden. Allerdings war unter Verwendung der beiden Testbedingungen keine vollständige Abtötung der Bakterien erreicht werden. Mit 0,25 % Glukose enthaltendem Medium konnten die CFUs auf maximal 99,7 % und bei Verwendung des Puffers auf maximal 95 % reduziert werden. Bei einem pH-Wert von 7,3 war der Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* sehr gering und die beobachteten Unterschiede lassen sich evtl. anhand der unterschiedlichen Anzahl der Bakterien vor der Inkubation mit dem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsprotein erklären. Bei *E. coli* ist bei einem pH-Wert von 5,5 ein deutlicher Unterschied zwischen den in 1 % Vollmedium (LB oder TSB) und den unter Verwendung von 0,25 % Glukose oder dem Puffer gewachsenen Bakterien zu erkennen. Eine vollständige Abtötung wird bei der Verwendung von Puffer oder 0,25 % Glukose bei einer Konzentration von 0,038 µM, bei Verwendung von 1% TSB bei 0,15 µM und bei 1% LB bei 0,6 µM erreicht. Die Unterschiede bei einem pH-Wert von 7,3 sind zum Teil auch durch die unterschiedliche Anzahl eingesetzter Bakterien erklärbar. So wurden bei Verwendung des Puffers 41000, bei 0,25 % Glukose 110000, bei 1 % TSB 59000 und bei 1 % LB 110000 CFUs eingesetzt. Im Puffer führte die Inkubation über 2h zu einer Reduktion um 32 % auf 25000, in 0,25 % Glukose um 24 % auf 80000 CFUs, in 1 % TSB zu einer Zunahme um 849 % auf 560000 und in 1 % LB um 473 % auf 610000 CFUs.

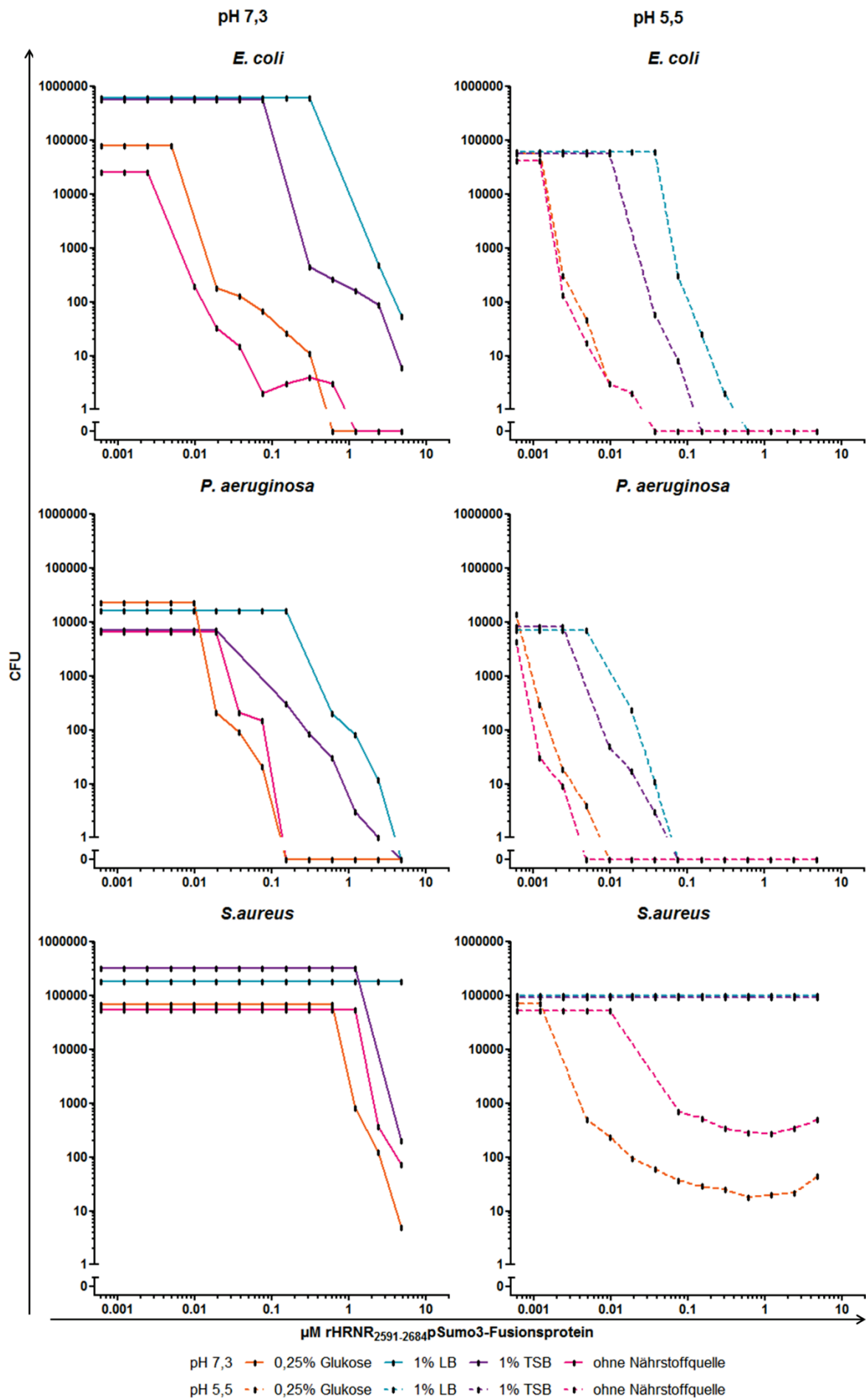


Abb. 43: Dosis-Wirkungs-Kurve der antimikrobiellen Aktivität des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSUMO3-Fusionsproteins in Abhängigkeit von der Nährstoffverfügbarkeit im MDA. Eingesetzt wurde das Protein in einer initialen Konzentration von 4,8 µM. Die Testung erfolgte in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7,3 oder 5,5 in Gegenwart von 0,25 % Glukose (13,88 mM), 1 % LB, 1 % TSB oder ohne eine zusätzliche Nährstoffquelle. Jeder vertikale Strich entspricht einem Messwert einer Verdünnungsstufe. Ist der Abstand zwischen den Strichen nicht äquidistant, so waren die CFUs nicht auszählbar und es wurde kein Messwert eingetragen. Dieses ist dann der Fall, wenn die CFUs nicht mehr voneinander abgegrenzt sind, visuell aber weniger CFUs als in der Kontrolle vorhanden waren.

Für *P. aeruginosa* konnte bei einem pH von 5,5 und der Verwendung des Puffers bei 0,6 nM eine signifikante antimikrobielle Aktivität detektiert werden. Bei 4,8 nM kam es zu einer vollständigen Abtötung wenn 20000 CFUs eingesetzt wurden.

5.12 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um erste Hinweise auf die Frage nach der Zielstruktur, die für die antimikrobielle Aktivität von Hornerinfragmenten gegen die Bakterien verantwortlich ist, zu erhalten, wurde mit Hilfe der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) versucht, solche Interaktionspartner zu identifizieren. Anhand der Ergebnisse aus der Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität konnte die Menge an Protein pro Bakterium berechnet werden, die notwendig ist, um dieses abzutöten. Aus technischen Überlegungen sind für die TEM-Untersuchungen mehr Bakterien pro Volumen notwendig als für die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität, somit ist auch eine höhere Konzentration an Protein notwendig. Bei der antimikrobiellen Testung konnte gezeigt werden, dass die Aktivität vom pH-Wert und dem zugesetzten Medium bzw. der verwendeten Kohlenstoffquelle abhängig ist. So zeigten alle getesteten Hornerinfragmente eine erhöhte Aktivität bei dem hautrelevanten pH-Wert von 5,5. Ultrastrukturelle Analysen von vier mit 50 µg rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ (250 µg/ml) bei pH 5,5 in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 0,25 % Glukose (13,88 mM) über 120 min behandelten unterschiedlichen Mikroorganismen ist in der Abb. 44 dargestellt.

Für alle vier untersuchten Mikroorganismen konnte für die gewählte Konzentration Veränderungen in der Morphologie der Bakterien und des Hefepilzes beobachtet werden. Diese Veränderungen betrafen hauptsächlich das Zytoplasma der Zellen. Hier war bei allen vier Mikroorganismen eine Zunahme zytoplasmatisch lokalisierter, elektronendichter Bereichen zu erkennen, die dem Zytoplasma ein granuliertes Aussehen verliehen. Bei *E. coli* und *P. aeruginosa* ist die Veränderung besonders auffällig. Bei *E. coli* beobachtet man zusätzlich eine großflächige Ablösung der Membran; allerdings scheint diese als ganzes noch intakt zu sein und auch die Bakterien scheinen nicht zu desintegrieren. Bei *P. aeruginosa*

waren Ausstülpungen zu erkennen, und auch hier schien die Membran intakt zu sein. Bei *C. albicans* war bei den mit rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ behandelten Zellen eine ausgeprägte Strukturierung im Zytoplasma und elektronendichte Bereiche sichtbar. An den äußeren Grenzen der elektronendichten Bereiche waren zum Teil membran-ähnliche Strukturen zu erkennen. Bei *S. aureus* führte die Behandlung zu Veränderungen im Zytoplasma. Auch hier kann man an der Membran kleine Ausstülpungen erkennen, die in der Kontrolle fehlen.

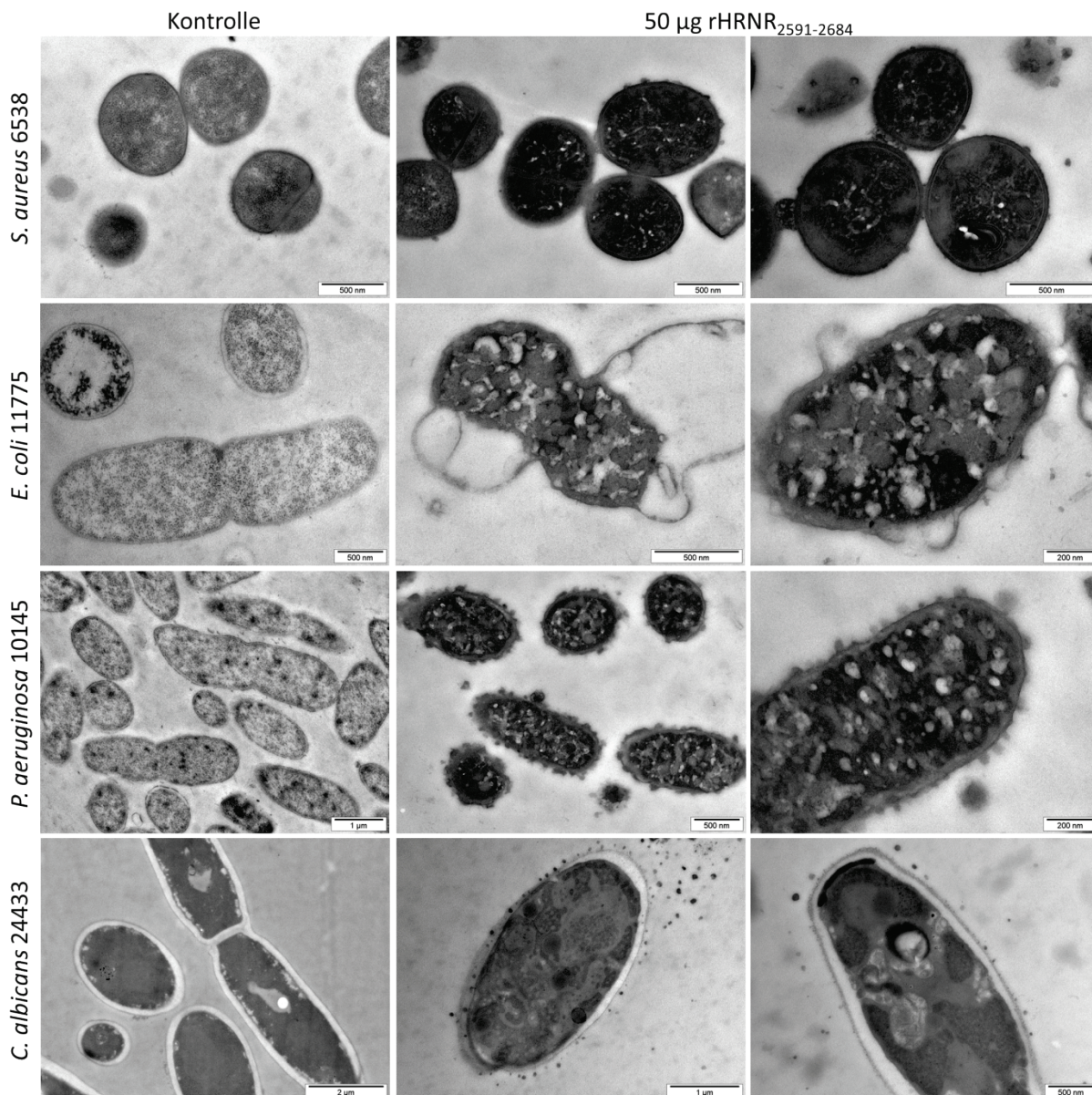


Abb. 44: Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) verschiedener Mikroorganismen nach Inkubation mit rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄. Die Inkubation erfolgte in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,5 mit 0,25 % Glukose (13,88 mM) über 120 min bei 37°C. Die Mikroorganismen wurden wie in den Antimikrobiellen Tests vorab in Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium kultiviert. In der linken Spalte ist die Kontrolle (50 µL 0,01 % Essigsäure) dargestellt, in den beiden rechten Spalten sind die mit 50 µg rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ in 50 µL 0,01 % Essigsäure behandelten Mikroorganismen in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt.

6 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit sollte sowohl das Protein Trichohyalin-like1 (TCHHL1), als auch die antimikrobielle Aktivität unterschiedlicher Hornerinfragmente untersucht werden.

In der Dissertation von Zhihong Wu (Wu, 2005) wurden die beiden Gene als Teil des EDC beschrieben. TCHHL1 und Hornerin gehören zur Gruppe der „S100 fused type“-Proteine (SFTPs), zu denen noch fünf weitere Proteine gezählt werden (Henry et al., 2012). Die Gene der SFTPs werden auf dem Chromosom 1q21.3 auf dem reversen Strang codiert (Abb. 12). Die genetische Struktur dieser sieben Proteine ist sehr ähnlich (Abb. 13). Mit Ausnahme des Trichohyalin bestehen alle aus drei Exons und zwei Introns. Die Proteinsequenz des Trichohyalin-like1 besteht aus 904 Aminosäuren, die des Hornerins aus 2850 Aminosäuren (Abb. 14). Es lassen sich durch bioinformatische Proteinanalysen außer einer Amino-terminalen S100-Calcium-Bindungsdomäne und einer EF-hand-like-Domäne keine weiteren bekannten Domänen innerhalb der Sequenzen finden. Auch konnte aus den Aminosäuresequenzen keine 3D-Struktur für die Proteine abgeleitet werden. Für TCHHL1 konnten, wie auch für die anderen SFTPs, mehrere repetitive Einheiten *in silico* detektiert werden. Die Struktur dieser Einheiten unterscheidet sich sehr voneinander, sowohl innerhalb eines SFTPs (am intensivsten bei TCHHL1 und TCHH), aber besonders zwischen den SFTPs (Abb. 16).

6.1 Expressions- und Funktionsanalysen des Trichohyalin-like1

Der phylogenetische Vergleich für TCHHL1 zeigte eine mit den tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnissen übereinstimmende Beziehung (Abb. 19). Orthologe zum humanen TCHHL1 konnten nur in Säugetieren identifiziert werden. Orthologe aus Vögeln zeigten lediglich eine maximale Übereinstimmung von 8 %. Diese befindet sich allerdings im Amino-terminalen Bereich, der S100-Domäne, die zwischen den SFTPs sehr große Ähnlichkeit aufweist (Abb. 15) und auch Bestandteil der S100 Proteine ist. Das Auftreten des TCHHL1 bei den Säugetieren stützt die Vermutung, dass dieses Protein in der Biochemie des Haares von Bedeutung ist (Alibardi, 2004). Ebenso könnte das Protein in den Schweißdrüsen eine Rolle spielen, da auch diese sich erst mit den Säugetieren entwickelt haben (Folk und Semken, 1991).

Im Zuge der Analyse des epidermalen Differenzierungskomplexes (EDC) wurde von Zhihong Wu eine TCHHL1-Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene durchgeführt. Diese zeigte eine ausgeprägte Expression in der Kopfhaut und der Haut des Kinns (Wu et al., 2011). Die Untersuchung der Proteinexpression von TCHHL1 sollte durch immunologische Techniken erfolgen. Zu diesem Zweck wurden zwei rekombinante Fragmente des TCHHL1 generiert (Abb. 20). Die Auswahl der Fragmente erfolgte in Anlehnung an die Informationen aus den Dissertationen von Zhihong Wu (Wu, 2005) und Britta Hansmann (Hansmann, 2009) sowie anhand der Voraussetzung für die Expression im SUMO-Expressionssystem (Zuo et al., 2005). Erste Untersuchungen mit den affinitätsgereinigten Antikörpern zeigten eine ausgeprägte Färbung der Epidermis sowie der Hautanhangsgebilde. Die Ursache für diese intensive Färbung könnte die Verwendung aller mit dem Antigen kreuzreaktiven Antikörperklassen sein, auch wenn der Sekundärantikörper spezies-spezifisch gegen IgGs gerichtet ist. Andererseits konnte in anderen epithelialen Geweben wie z. B. Lunge, Speiseröhre oder Zunge keine Reaktivität nachgewiesen werden. Nach einer weiteren Reinigung der Antikörper mittels Protein G- und einer Depletion mittels SUMO-Tag-Affinitäts-chromatographie, zeigte sich nur noch in den Haaren eine Immunreaktivität (Abb. 21). Bei einer ähnlichen, aber nicht identischen Lokalisation des TCHH, nachgewiesen durch den monoklonalen Antikörper AE15, und des TCHHL1, nachgewiesen durch den polyklonalen Antikörper α -hTCHHL1-K2, stellte sich die Frage ob es sich hierbei um das gleiche Antigen handelt.

Um diese Frage zu beantworten, wurde unter verschiedenen Versuchsbedingungen Gesamtprotein aus unterschiedlichen Lokalisationen der Haut (Vollhaut, Epidermis, Kallus und Haarwurzeln) gewonnen. Allerdings konnte in keinem der Extrakte TCHHL1 per Immundetektion nachgewiesen werden. Die Kontrollen zeigten hingegen, dass die Extraktion als solche erfolgreich war. Eine andere Möglichkeit native Proteine zu gewinnen, ist die Stimulation der Differenzierung von primären Keratinozyten, um in diesen die Expression von differenzierungsabhängigen Proteinen zu induzieren (Abb. 22). Die Überstände als auch die lysierten Zellen zeigten ab dem 6. Tag nach Stimulation mit Ca^{2+} eine große Anzahl von Banden, die zum Teil auch weit oberhalb der erwarteten Bande von ca. 100 kDa lagen. Interessanterweise zeigte sich im Bereich der erwarteten Bande von ca. 100 kDa eine Doppelbande, was auf eine mögliche Modifikation des Proteins hindeuten kann. Diese Doppelbande nahm im Laufe der Differenzierung ab und es traten weitere Banden, die möglichen Multimeren entsprechen könnten, auf. Deren Intensität nahm über die Zeit zu, bis

nur noch höhermolekulare Banden zu detektieren waren. Für das mit RIPA-Puffer gelöste Keratinozytenlysat ließ sich nur eine sehr hochmolekulare Bande oberhalb der 260 kDa Bande des Komigrationsstandards, sowie eine wolkige Immunreaktivität, die in ihrer Position etwa der Auftragungstasche entspricht, detektieren. Warum die Immunreaktivität in der Immunhistochemie auf bestimmte Keratinozyten des Haares beschränkt ist, während sie in den durch Stimulation differenzierten Keratinozyten ab Tag 6 im Überstand und bei den am Tag 18 lysierten Zellen nachweisbar sind, konnte nicht geklärt werden. Die Ergebnisse deuten auf eine Veränderung des Proteins im Laufe der Differenzierung durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) hin. In der Epidermis und im Haar spielen vor allem drei PTMs eine Rolle, die Phosphorylierung (Lonsdale-Eccles et al., 1982; Nakamura et al., 2002), die Citrullinierung (Mechin et al., 2005; Nachat et al., 2005) und die Transglutaminierung (Eckert et al., 2005b; Thibaut et al., 2005). Alle PTMs bieten eine Erklärung, warum es nicht möglich war, in den vier untersuchten Lokalisationen der Haut immunreaktives TCHHL1 nachzuweisen. Durch Citrullinierung oder Phosphorylierung könnte die Antigenität des TCHHL1 so stark verändert sein, dass ein Nachweis über den polyklonalen TCHHL1-Antikörper, der gegen das nicht modifizierte TCHHL1 generiert wurde, nicht mehr möglich ist (Lothrop et al., 2013; Zhao und Jensen, 2009). Durch die Transglutaminierung könnte die dabei entstehende Vernetzung dazu führen, dass eine Extraktion nicht mehr möglich ist. Zusätzlich kann durch die Ausbildung der Isopeptidbindungen eine Maskierung der antigenen Determinanten erfolgen. Eine Möglichkeit den proteinbiochemischen Nachweis per Western-Blot-Analyse zu führen wäre, die Isopeptidbindung zu spalten oder durch Proteasen Fragmente aus dem transglutaminierten TCHHL1 herauszuschneiden und diese nachzuweisen. Die spezifische Spaltung der Isopeptidbindung ist chemisch bisher nicht möglich. Enzymatisch lassen sich Isopeptidbindung durch sogenannte Isopeptidasen oder Omega-Peptidasen hydrolysieren. Diese Enzyme sind entweder hochspezifisch wie die Deubiquitinierungs-Enzyme und die SUMO-Proteasen oder aber noch nicht hinreichend untersucht wie die Destabilase. Für die mit den Proteasen Trypsin, Lys-C oder Asp-N behandelten Extrakte konnte kein TCHHL1 nachgewiesen werden. In Proteomstudien des Haares konnten nur sehr kleine Fragmente des Trichohyalins nachgewiesen werden; als mögliche Ursache kommt der hohe Vernetzungsgrad und die Umwandlung der Arginine in Citrulline in Betracht (Lee et al., 2006). Damit wird die Proteolyse durch Trypsin und die massenspektrometrische Detektion gleich doppelt erschwert, da Trypsin die zu Citrullin veränderten Arginine nicht mehr als Schnittstellen

erkennt (Bennike et al., 2013; Wildeman und Pires, 2013) und die per N^ε-(γ-glutamyl)lysin vernetzten Peptide in der MS-MS-Analyse nur schwer zugänglich sind (Hoffner et al., 2009; Nemes et al., 2005). Außerdem kann auch das Laufverhalten in der SDS-PAGE durch Multimerisierung oder die Vernetzung mit anderen Substraten beeinflusst werden.

Deshalb wurde nachfolgend überprüft, ob diese posttranslationalen Modifikationen der verwendeten Proteine *in vitro* möglich sind. Bisher ist nicht genau bekannt, welche Aminosäuresequenz oder Strukturmerkmale notwendig sind, damit eine Transglutaminierung erfolgt. Beschrieben wurde allerdings, dass die Zugänglichkeit des Lysins oder Glutamins entscheidend sind (Facchiano und Facchiano, 2009; Fontana et al., 2008). Aufgrund der hohen Flexibilität des TCHHL1 kann davon ausgegangen werden, dass ein großer Teil der Lysine und Glutamine für die Transglutaminierung zur Verfügung steht. Bei allen vier verwendeten rekombinanten Proteinen konnte durch Zugabe von Transglutaminase 1 und CaCl₂ die Immunreaktivität stark abgeschwächt werden (Abb. 23). Neue Banden waren oberhalb von 260 kDa und in der Auftragungstasche zu detektieren. Auffällig war außerdem, dass drei der vier TCHHL1-Fragmente ein von ihrer molekularen Masse abweichendes Laufverhalten zeigten. Das rTCHHL1₁₄₋₂₄₈ mit einer berechneten molekularen Masse von 26 kDa, zeigte in der Western-Blot-Analyse durch den Komigrationsstandard abgelesene molekulare Massen von ca. 40, 55 und 95 kDa. Das rTCHHL1₃₆₉₋₇₈₄ mit der berechneten molekularen Masse von 45 kDa zeigt in der Western-Blot-Analyse eine Bande bei 45 und eine Doppelbande bei ca. 80 und 100 kDa. Das rTCHHL1₉₀₋₂₄₈ mit einer berechneten molekularen Masse von ca. 17,5 Da war in der Western-Blot-Analyse bei einer Masse von 26 und 52 kDa zu detektieren. Das rTCHHL1₃₆₉₋₅₃₆ mit einer berechneten molekularen Masse von ca. 18,5 kDa zeigte in der Western-Blot-Analyse eine Bande bei ca. 27 und 54 kDa. Alle TCHHL1-Proteine migrieren langsamer als die Proteine des verwendeten Komigrationsstandards. Zusätzlich traten bei allen Proteinen Banden eines möglichen Dimers auf. Über die Ursachen für dieses Verhalten lässt sich anhand der Daten nur spekulieren. Die abweichende Migration beruht wahrscheinlich auf einem nicht idealen Verhalten der Proteine in der SDS-PAGE. Für ideales Verhalten in der SDS-PAGE werden globuläre Proteine, die keine Interaktion mit der Matrix zeigen, vorausgesetzt. Dieses scheint für drei der vier hier untersuchten Proteine nicht der Fall zu sein. In diesem Versuch ist nur überprüft worden, ob eine Transglutaminierung mit sich selbst möglich ist. Um zu untersuchen ob auch eine Transglutaminierung mit anderen Proteinen der Haut erfolgt, könnten Extrakte aus unterschiedlichen Lokalisationen der Haut oder aus differenzierenden

Keratinocyten zusammen mit dem rekombinanten TCHHL1 für eine Transglutaminierung verwendet werden.

Die Citrullinierung drei verschiedener rTCHHL1-Fragmente mit PAD1 führte bei zwei Fragmenten zu einer Maskierung der Epitope (Abb. 24). Es zeigte sich allerdings, dass der Ziege- α -rTCHHL1₁₄₋₂₄₈-Antikörper das Fragment rTCHHL1₁₄₋₂₄₈ unter den Testbedingungen wesentlich besser erkennt als das Fragment rTCHHL1₉₀₋₂₄₈, das keinen Teil der S100-Domäne enthält. Die citrullinierten Proteine wiesen in der SDS-PAGE ein reduziertes Migrationsverhalten auf. So verschwindet beim rTCHHL1₉₀₋₂₄₈ im Silbergel durch die Zugabe von 10 mM CaCl₂ die nicht immunogene Bande bei 15 kDa. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es zu einer Interaktion zwischen den Ionen und dem Protein kommt, die zu einer Strukturveränderung und damit auch zu einem veränderten Migrationsverhalten führt. Beim rTCHHL1₃₆₉₋₅₃₆ kommt es durch die Zugabe von 10 mM CaCl₂ zu einer kompletten Veränderung des Bandenmusters und zu einem nahezu kompletten Verlust der immunogenen Eigenschaften. Generell ist die Anfärbbarkeit in der Silberfärbung bei diesen Proteinen sehr unterschiedlich. So lässt sich das rTCHHL1₁₄₋₂₄₈, das noch einen Teil der S100-Domäne enthält, sehr viel besser mit Silber anfärben als die beiden anderen Proteine, die nur Teile aus dem repetitiven Bereich enthalten (Abb. 24).

Bei der funktionellen Untersuchung des TCHHL1 stellte sich die Frage, ob die Haare als Hautanhangsgebilde, die tief in der Dermis verwurzelt sind und eine direkte Verbindung mit der Oberfläche aufweisen, einen besonderen Schutz benötigen, um gegen eindringende Mikroorganismen geschützt zu sein. Sollten eingedrungene Bakterien sich im Bereich der Haarwurzel intensiv vermehren können und dabei die Basalmembran durchbrechen, könnten sich diese Bakterien in der Dermis oder Subkutis verbreiten und dort zu einer Entzündung führen. Es ist bekannt, dass die beiden Proteine HRNR und FLG2 Bereiche mit antimikrobieller Aktivität enthalten. Deshalb wurden die vier TCHHL1-Proteine auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Die Untersuchung erfolgte mit den Standardkeimen unter den Standardbedingungen und zeigte nur eine minimale Aktivität gegen *E. coli* (Tab. 5). Aus neueren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist inzwischen bekannt, dass es notwendig ist, die Testbedingungen an die vorherrschenden Bedingungen in dem Gewebe, aus dem der hypothetische antimikrobielle Faktor stammt, anzupassen. Nur auf diese Weise ist eine optimale Detektion der antimikrobiellen Aktivität möglich. Die Parameter, die bei dem Design

der Testbedingungen berücksichtigt werden müssen, sind unter anderem: der Sauerstoffgehalt, das Redoxpotential, die Verfügbarkeit von Nährstoffen und freiem Wasser, der pH-Wert, die Temperatur und die Konzentration von Ionen. Das Infundibulum des Haares enthält die Produkte aus der Talgdrüse (Triglyceride, Wachsester, Squalen, Cholesterol und Cholesterolester (Lee, 2011)) und die Strukturen der inneren Haarwurzelscheide (Horenstein und Simon, 2007), die als Nährstoff für Mikroorganismen zur Verfügung stehen. Welche Werte die anderen genannten Parameter in anderen Bereichen des Haarfollikels aufweisen, lässt sich anhand der Literatur nur bedingt feststellen. Bekannt ist, dass *Propionibacterium acnes* als fakultativ anaerobes Bakterium die „pilosebaceous unit“ besiedelt (Aubin et al., 2014). Dabei werden die Triglyceride als Nahrungsquelle genutzt und Fettsäuren freigesetzt, die antimikrobielle Aktivität besitzen und den pH auf einen Wert von 5,0 absenken können (Grice und Segre, 2011). Eine Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität unter veränderten Testbedingungen hat nicht stattgefunden, sollte aber in zukünftigen Untersuchungen durchgeführt werden. Da es sich, wie schon in der Einleitung beschrieben, beim Haarfollikel um ein immunprivilegiertes Gewebe handelt, sollte davon ausgegangen werden, dass diese Einheit damit unter dem besonderen Schutz des angeborenen Immunsystems steht. Da die im „Bulge“ vorhandenen Stammzellen für die Regeneration der Haut und der Haarwurzel von entscheidender Bedeutung sind (Cotsarelis et al., 1990; Taylor et al., 2000), erscheint es logisch, dass besonders dieser Bereich vor Mikroorganismen, sowohl Kommensalen als auch Pathogenen, geschützt werden muss.

6.2 Untersuchungen zur Rolle von Hornerin-Fragmenten als antimikrobielle Faktoren

Eine besondere Herausforderung bereitete die Klonierung der verschiedenen Hornerinfragmente. Aufgrund der repetitiven Sequenzen des Hornerins können spezifische Oligonukleotide nur für den Amino- und Carboxy-terminalen Bereich des Hornerins hergestellt werden. Oligonukleotide für den Bereich der repetitiven Sequenzen ließen sich aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen diesen nicht hinreichend spezifisch generieren. Somit ist eine Auswahl der amplifizierten Sequenz nur durch ein spezifisches Oligonukleotid aus dem Amino- oder Carboxy-terminalen Bereich in Kombination mit einem Oligonukleotid aus den repetitiven Sequenzen und eine Auswahl des Amplifikats mit der gewünschten Länge möglich. Eine weitere Option ist die Verwendung zweier Oligonukleotide aus den repetitiven

Sequenzen und der zufälligen Auswahl eines Amplifikats und der anschließenden Sequenzierung.

Wie in Abb. 14 dargestellt sind alle repetitiven Einheiten des Hornerins im Exon3 kodiert, so dass eine Amplifikation der repetitiven Einheiten des Hornerins von genomischer DNA als „Template“ möglich ist. Aufgrund der Länge des Hornerins von 8553 bp, des GC-Gehalts von 58,1 % oder der Qualität der verwendeten cDNA konnte eine Amplifikation des gesamten kodierenden Bereichs auch mit einem speziell für diesen Zweck angepassten PCR-System nicht erreicht werden. Die Amplifikation von cDNA als „Template“ führte nur bei kleinen Produkten zum Erfolg. Die Verwendung einer Mischung genomischer DNA unterschiedlicher Spender als „Template“ führte dazu, dass in den sequenzierten Klonen viele Variationen einzelner Basenpaare (SNPs) nachgewiesen werden konnten, die sich aus Ungenauigkeiten bei der Amplifikation nicht erklären lassen. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den in der Ensembl Datenbank verzeichneten hohen Anzahl von SNPs im Hornerin. Zum Zeitpunkt der Abfrage (Juni 2015) waren schon mehr als 1600 Sequenzvariationen verzeichnet (Abb. 53 im Anhang).

Bei der Expression traten mehrere Besonderheiten auf. Das in der Arbeitsgruppe verwendete pET32a-Expressionssystem konnte aufgrund der für die Spaltung des Fusionsproteins notwendigen Enterokinase nicht eingesetzt werden, da deren unspezifische Aktivität (Liew et al., 2005) das Zielprotein nahezu vollständig hydrolysierte. Diese Empfindlichkeit des Hornerins konnte auch anhand eines in dem SUMO-Expressionssystem hergestellten Hornerinfragments bestätigt werden (Abb. 35A). Erste Expressionsversuche mit *E. coli* BL21(DE3)pLysS zeigten in der Analyse viele verkürzte Fusionsproteine. Diese können durch sogenannte „rare codons“ in der DNA-Sequenz des Hornerins erklärt werden. Um die Anzahl dieser verkürzten Fusionsproteine zu minimieren, wurden *E. coli*-Zellen des Stammes Rosetta-gami 2 verwendet. Diese enthalten ein Plasmid namens pRARE2, das für zusätzliche, in *E. coli* seltene, tRNAs kodiert und so in der Lage ist, diese Sequenzabbrüche zu reduzieren (Burgess-Brown et al., 2008). Mit dieser Methode war es möglich, alle benötigten Fusionsproteine in ausreichender Menge zu exprimieren. Das Protein konnte aus dem Überstand, der mit Ultraschall behandelten Bakterien gewonnen werden. Eine Einlagerung in „inclusion bodies“ wurde nicht nachgewiesen.

Das so im SUMO-System hergestellte Fusionsprotein wurde per IMAC (Abb. 25) aus dem Bakterienlysat isoliert. Hierbei wurden bei der Elution bei einigen Fusionsproteinen zwei Peaks

detektiert. Der erste Peak enthielt kein nachweisbares Protein, der zweite entsprach dem Fusionsprotein. Was die Absorption des ersten Peaks verursacht hat, konnte nicht geklärt werden. Da diese Absorption aber mehrfach sporadisch bei unterschiedlichen Expressionen auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei nicht um einmalige Kontaminationen handelt. Die anschließende IP-RPC der das Protein enthaltenden Fraktion zeigte in den meisten Fällen einen Peak, der fast die gesamte Absorption in der Elution ausmachte (Abb. 26). Die massenspektrometrische Analyse des Fusionsproteins zeigte auch bei großen Mengen an Protein ein nur sehr geringes Signal. Es wurde festgestellt, dass die Signalintensität der Fusionsproteine sehr viel niedriger als von Proteinen mit ähnlicher molekularer Masse waren. Zum Teil konnte außer einem kontinuierlichen Spektrum um einen m/z -Wert von 800 kein weiteres Signal detektiert werden. Das beschriebene Signal ist auch zum Teil im Rohdatenspektrum in der Abb. 27 zu sehen; hier ist allerdings auf diesem kontinuierlichen Signal noch das Spektrum der Ionen unterschiedlicher Ladungszustände des Fusionsproteins zu sehen. Eine mögliche Erklärung für das kontinuierliche Spektrum könnten Multimere sein, die sich vor der Ladungsübertragung gebildet haben, und dann in vielen verschiedenen Ladungszuständen vorkommen. Bei der molekularen Masse des Fusionsproteins von über 20 kDa, der Multimerisierung und der unterschiedlichen Anzahl an Ladungszuständen der Multimere ist es denkbar, dass ein kontinuierliches Spektrum entsteht. Für ein amyloides Peptid aus 11 Aminosäuren ist ein ähnlicher Befund schon gezeigt worden (Cole et al., 2010); dort wurde allerdings kein kontinuierliches Spektrum gefunden, sondern distinkte Zustände entdeckt, die dann Multimeren mit unterschiedlichen Ladungszuständen zuzuordnen sind. Um die Hypothese der Multimerisierung zu überprüfen, wäre eine Analyse per Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie eine Option. Hierbei können Proteine mit unterschiedlicher Faltung und dem daraus bedingten unterschiedlichen hydrodynamischen Radius und gleichem Masse zu Ladung-Verhältnis getrennt werden.

Die Hornerin-Fusionsproteine wurden im nächsten Schritt per Größenausschlusschromatographie in PBS umgepuffert. Erfolgte die Umpufferung in Wasser, um so das Protein besser lyophilisieren zu können, waren zusätzliche Peaks zu detektieren. Diese konnten nicht eindeutig dem Salz oder dem Protein zugeordnet werden.

Trotz konstanter Versuchsbedingungen bildeten sich nach der IMAC, aber auch nach der SEC gelegentlich Präzipitate. Die Ursache der Bildung dieser Präzipitate konnte nicht bestimmt

werden und machte die Reinigung der Fusionsproteine zu einer Herausforderung. Dieses ist besonders ungewöhnlich, da das verwendete SUMO-Expressionssystem laut Hersteller durch den Fusionstag die Löslichkeit des Fusionsproteins verbessern soll (Peroutka III et al., 2011).

Das in PBS befindliche Protein wurde im folgenden Schritt mit der SUMO-Protease 2 über Nacht in Anwesenheit von DTT oder TCEP inkubiert. Der Hersteller gibt eine Verdauzeit von 1 h bei 30°C an, bei dem mit 1 U mehr als 90% von 100 µg des SUMO3-GFP Kontrollproteins verdaut werden. Bei keinem der Hornerin-Fusionsproteine konnte unter diesen Bedingungen ein Verdau von mehr als 90% erreicht werden. Die optimale Zeitspanne für den Verdau betrug 12 bis 24 h. Eine verlängerte Zeitspanne erhöhte nur noch minimal die Menge an geschnittenem Protein. Auch der Einsatz erhöhter Mengen an SUMO-Protease 2 änderte an der Ausbeute des verdauten Proteins nichts. Zum Teil konnte die geringe Effizienz auf eine niedrige Aktivität der SUMO-Protease 2 zurückgeführt werden. Entscheidend war aber die Konzentration des Fusionsproteins; wurde das Fusionsprotein in einer Konzentration von mehr als 200 µg/ml eingesetzt, bedingte das eine verringerte Effizienz.

Die sich anschließende IP-RPC (Abb. 29) zeigte trotz gleicher Versuchsbedingungen für jeden Verdau unterschiedliche Anteile an maturem Protein, unverdaulichem Fusionsprotein und pSUMO3-Protein. Interessanterweise konnte in einem erneut angesetzten Verdau des unverdaulichem Fusionsproteins aus einem vorangegangenen Verdau nur zu maximal 2 % proteolytisch gespalten werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine Blockierung der Interaktion zwischen SUMO-Tag und SUMO-Protease durch falsche Faltung des SUMO-Tag oder Multimerisierung des Fusionsproteins sein. Außerdem kam es bei der IP-RPC zu einer Überlagerung des Signals von DTT und dem Zielprotein. Die Verwendung von TCEP als alternatives Reduktionsmittel war nicht immer erfolgreich. Die Veränderung des Gradienten konnte das Problem bei manchen Fragmenten beheben, war allerdings nicht in allen Fällen erfolgreich.

Die massenspektrometrische Analyse der Fraktionen aus der IP-RPC (Abb. 30) zeigte für das Fusionsprotein ein nicht auswertbares Spektrum, dessen Ursache, wie bereits beschrieben, die Multimerisierung sein könnte. Die Signale für das mature Protein und des pSUMO3-Protein zeigten die berechneten Massen.

Aufgrund des hohen Anteils von Glycinen und Serinen und der sich wiederholenden aromatischen und langkettigen aliphatischen Aminosäuren in der Sequenz des Hornerins

wurde basierend auf dem Glycinloop-Modell (Steinert et al., 1991) eine mögliche Struktur für ein Hornerin-Fragment postuliert (Abb. 31). Ob diese Struktur für die antimikrobielle Aktivität des Hornerins verantwortlich ist, sollte durch die Mutation der aromatischen und langkettigen aliphatischen Aminosäuren untersucht werden. Allerdings konnte nur eine geringgradige Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von der postulierten Struktur festgestellt werden. Die leicht verringerte antimikrobielle Aktivität kann auch durch eine andere Konzentrationsbestimmung für das mutierte Protein erklärt werden. Im Gegensatz zum unveränderten Protein kann für das mutierte Protein keine Konzentrationsbestimmung über die Absorption bei 280nm erfolgen. Alternativ wurde ein kolorimetrisches Verfahren verwendet, bei dem die Konzentrationsbestimmung immer im Vergleich zu einem Standardprotein erfolgt. Dieses Standardprotein sollte idealer Weise das zu untersuchende Protein sein, was aber in den seltensten Fällen realistisch ist. Bei dem Vergleich mit einem Standardprotein kann es zum Teil zu ausgeprägten Abweichungen in der Konzentrationsbestimmung kommen (Noble et al., 2007; Strug et al., 2014). Da die Konzentration der Proteinlösung vor der Verwendung im antimikrobiellen Test nicht erneut gemessen wurde, haben neben der Ungenauigkeit in der Konzentrationsbestimmung auch mögliche Verluste in der folgenden Gefriertrocknung Einfluss auf das Ergebnis der antimikrobiellen Testung.

Die CD-Spektroskopie bei pH 5,5 zeigte für keines der untersuchten HRNR-Fragmente typische Sekundärstrukturelemente wie β -Faltblätter oder α -Helices, sondern wies die für ungeordnete Strukturen typische Absorptionseigenschaften auf. Die Erwärmung des Proteins auf 90°C führte nicht zu Veränderungen in der Elliptizität. Die Daten lassen somit auf eine Struktur ohne typische Sekundärelemente schließen, die durch Erwärmen nicht verändert wird (Abb. 32). Bei einem pH-Wert von 7,2 zeigte sich ein identisches Bild. Bei Messungen der Temperaturabhängigkeit der Elliptizität für rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ bei 222 nm in einem 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 konnte ein Anstieg der Flexibilität des Proteins mit steigender Temperatur nachgewiesen werden. Da keine Sekundärstrukturelemente detektierbar waren, könnten die untersuchten Fragmente zu den sogenannten „Intrinsically Disordered Proteins, IDPs“ gehören. Weitere Merkmale wie ein hoher Anteil an der Unordnung zuträglichen Aminosäuren, ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE und eine im Vergleich mit den Standardproteinen geringe Temperaturempfindlichkeit unterstützen diese Hypothese (Abb. 34). Alle weiteren Methoden der biophysikalischen Charakterisierung, wie

z. B. NMR-Untersuchungen oder Ionenmobilitäts-MS sind mit sehr hohem apparativem Aufwand verbunden und standen nicht im Fokus der Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität des Hornerins.

Eine erhöhte Proteolyseempfindlichkeit wurde für IDPs bereits beschrieben (Suskiewicz et al., 2011). Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass IDPs von Natur aus instabil sind und stabilisiert werden müssen, damit sie nicht proteolytisch abgebaut werden, wohingegen globuläre Proteine von Natur aus stabil sind und destabilisiert werden müssen, damit sie proteolytisch abgebaut werden können. Für zwei Hornerinfragmente ließ sich mit verschiedenen Proteasen eine hohe Empfindlichkeit nachweisen. Hornerin konnte durch die beiden Proteasen Enterokinase EKMax und Lys-C trotz fehlender Schnittstellen proteolytisch verdaut werden (Abb. 35). Das Problem der Spezifität der Enteropeptidase EKMax ist bekannt. So erfolgt neben der hydrolytischen Spaltung nach der spezifischen Sequenz Asp-Asp-Asp-Asp-Lys z. B. auch eine Spaltung nach der Sequenz Leu-Lys-Gly-Asp-Arg (Liew et al., 2005). Diese Problematik wurde durch die Verwendung des pSUMO3-Expressionssystems und der Verwendung der SUMO-Protease2 umgangen. Der Vergleich mit den beiden Standardproteinen BSA und Cytochrom C zeigt eine um das zehn bis hundertfache gesteigerte Empfindlichkeit des Hornerins gegenüber den getesteten Proteasen mit Ausnahme von Lys-C (Abb. 36). Da Proteasen in der Haut eine zentrale Rolle für die Differenzierung spielen (Rawlings und Voegeli, 2013), ist die Empfindlichkeit des Hornerins sowohl gegenüber Proteasen der Haut als auch gegenüber bakteriellen Proteasen (Koziel und Potempa, 2013) von Interesse. Eine Überprüfung der Proteolyseempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Kallikreinen, Elastase, Plasmin, Thrombin sowie α -Chymotrypsin, Trypsin und Lys-C erfolgte für rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ und die citrullinierte Form dieses Fragments. Die Citrullinierung von Proteinen in der Epidermis ist, wie bereits schon erwähnt, eine typische posttranslationale Modifikation für dieses Gewebe. Dabei ließ sich eine Änderung der Spezifität der untersuchten Proteasen nachweisen. So konnte für KLK5 gezeigt werden, dass es rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ schneidet, das citrullinierte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ sich aber nicht proteolytisch beeinflussen lässt. Für KLK8 und Lys-C verhält es sich genau umgekehrt (Tab. 6). Für Filaggrin und Filaggrin-2 konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deiminierung zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Calpain 1 und Bleomycin Hydrolase führt (Hsu et al., 2011; Kamata et al., 2009; Yamazaki et al., 1997). Somit kann davon ausgegangen werden, dass posttranslationale Modifikationen z. B. in Form

von Citrullinierungen ein weiterer Regulationsmechanismus in der proteolytischen Prozessierung von Hornerin sein können.

Der Versuch, ein Fragment des Hornerins zu exprimieren und dann mit Hilfe von Proteasen der Haut in Fragmente zu zerlegen, um diese auf antimikrobielle Aktivität zu überprüfen, scheiterte an der Expression dieses Fragments. Geplant war ein aus ca. 500 Aminosäuren des C-Terminus bestehendes Protein zu exprimieren. Dabei wurde initial aufgrund der Verfügbarkeit der Oligonukleotide mit einem Fragment von 275 Aminosäuren gestartet. Das Plasmid für die Expression konnte erfolgreich erstellt werden, die Expression zeigte aber in der Massenspektrometrie kein Protein mit der erwarteten molekularen Masse. Genauere Untersuchungen hierzu wurden nicht durchgeführt. Somit konnte auch bisher nicht geklärt werden, welchen Einfluss Proteasen der Epidermis auf die Prozessierung der Repeats des Hornerins haben.

Für alle Fragmente aus dem Bereich der Sequenzwiederholungen konnte im RDA eine Aktivität gegen *P. aeruginosa* und *E. coli* nachgewiesen werden (Tab. 7). Gegen *S. aureus* konnte unter den gewählten Testbedingungen von pH 7,3 und 1% TSB für keines der untersuchten Fragmente eine antimikrobielle Aktivität gezeigt werden. Gegen *C. albicans* zeigte rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ eine Aktivität mit geringem Wachstum im Hemmhof. Dieses Ergebnis wurde im Mikroverdünnungstest (MDA) bestätigt; allerdings konnte hier keine Aktivität für rHRNR₁₀₇₅₋₁₁₇₂ beobachtet werden. Ein Vergleich der antimikrobiellen Aktivitäten des rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ und des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ ergab nur einen geringfügigen Unterschied (Abb. 39). Deshalb wurde für die weiteren Analysen auf das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ zurückgegriffen.

Durch die Mutation der aromatischen und langkettigen aliphatischen Aminosäuren im rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ wurde gezeigt, dass diese Aminosäuren keinen oder aber nur einen sehr geringen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität haben (Abb. 40). Das von Steinert postulierte Glycinloop-Modell (Steinert et al., 1991) geht davon aus, dass unter der Einwirkung von moderatem Stress oder Zug auf die Epidermis es zu einer Lösung der hydrophoben Interaktionen innerhalb des Moleküls und der Ausbildung von hydrophoben Interaktionen mit anderen Molekülen kommt, die bei Nachlassen der Stressbedingungen in den Ausgangszustand zurückkehren. Mit diesem Modell lassen sich die hohe Flexibilität und der Erhalt der Barriere erklären. Eine mögliche Erklärung wäre eine Doppelfunktion des Hornerins als strukturgebendes und antimikrobielles Protein.

Die neun Arginine im rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ sind für die antimikrobielle Wirkung wichtig. So führt die enzymatische Deiminierung der Arginine in Citrulline im RDA zu einem vollständigen Verschwinden der antimikrobiellen Aktivität (Tab. 8) sowie im MDA zu einer Verringerung der Wirkung gegen *P. aeruginosa* und *C. albicans* und einem vollständigen Verschwinden der Aktivität gegen *E. coli*. Die Aktivität gegen *S. aureus* verringert sich unter den Testbedingungen nur geringfügig (Abb. 41). Ob eine solche Reaktion *in vivo* tatsächlich stattfindet, konnte nicht geklärt werden. Für das Filaggrin ist allerdings bekannt, dass die Deiminierung der entscheidende Schritt in der Trennung von den Filamenten der Zytokeratinmatrix sowie der Regulation der Proteolyse und der Produktion der natürlichen Feuchtigkeitsfaktoren (NMFs) ist (Kalinin et al., 2001; Mechin et al., 2005). Eventuell ist die Deiminierung ein Mechanismus, um der Resistenzentwicklung entgegenzuwirken. Wird antimikrobiell wirksames Hornerin im Verlauf der Differenzierung enzymatisch citrulliniert und somit inaktiviert, so besteht die antimikrobielle Aktivität nur innerhalb einer Schicht der Epidermis, so dass auch nur innerhalb dieser Schicht eine Resistenzentwicklung erfolgen könnte. Neben den neun Argininen sind auch noch acht Glutamine und elf Histidine im rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ vorhanden, die für die antimikrobielle Aktivität mitverantwortlich sein könnten. Um deren Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität zu untersuchen, müssten die Glutamine gegen Glycin mutiert werden, was aufgrund der Anzahl und der Verteilung relativ aufwendig ist. Die elf Histidine könnten hingegen chemisch modifiziert werden. Dafür stehen mehrere Verfahren zur Verfügung (Lundbald, 2005), wobei Diethylpyrocarbonat (DEPC) das gebräuchlichste Reagenz ist (Wolf et al., 1970). Es erfolgt eine Modifikation des Histidins zu N-Carbethoxyhistidin, was bei RNasen zur Hemmung ihrer enzymatischen Aktivität führt.

Da sich die antimikrobiellen Aktivitäten zwischen dem rHRNR₂₅₇₆₋₂₇₀₇ und dem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ nur wenig unterscheiden (Abb. 39), stellt sich die Frage ob eventuell auch kürzere Fragmente des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ eine antimikrobielle Aktivität aufweisen. In den beiden Amino-terminalen Fragmenten rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₀₉ und rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₁₈ konnte keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Das Fragment rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₄₄ zeigte als pSUMO3-Fusionsprotein eine mit dem rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ vergleichbare antimikrobielle Aktivität. Interessanterweise wies das rHRNR₂₆₃₈₋₂₆₈₄ im Vergleich zu rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ im RDA (Tab. 9) eine deutlich schlechtere antimikrobielle Aktivität auf als im MDA, in dem der Unterschied nicht so ausgeprägt war. Die Ursache für diese Unterschiede konnte nicht geklärt werden. Wird das rHRNR₂₆₅₆₋₂₆₈₄ um die beiden Amino-terminalen Aminosäuren Glycin und Arginin verkürzt, so wurde eine weitere

Abnahme der antimikrobiellen Aktivität beobachtet (Abb. 42). Dieses bestätigt die bereits im vorherigen Abschnitt beschriebene Notwendigkeit der Arginine für die antimikrobielle Aktivität.

Nachdem die antimikrobiellen Tests anfangs unter den Standardbedingungen, d.h. in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 bis 7,4 mit 1 % TSB, durchgeführt wurden, stellte sich die Frage, in wie weit diese Testbedingungen den Bedingungen *in vivo* auf der Epidermis und in den obersten Schichten des Stratum corneum entsprechen. Generell sollten sich die Bedingungen, unter denen die antimikrobielle Testung erfolgt, an den physiologischen Werten des Gewebes bzw. der Umgebung orientieren, aus dem der zu testende Stoff stammt. So unterscheiden sich Haut, Schleimhäute, Darm, Lunge oder Blut in ihren physikochemischen Parametern wie pH-Wert, Verfügbarkeit von Wasser, Sauerstoffpartialdruck, Osmolarität, Nährstoffverfügbarkeit und weiteren Parametern. Generell beeinflusst die Änderung der Testparameter das Wachstum der Bakterien. Es besteht immer das Problem, ein ausgewogenes Verhältnis zwischen den optimalen Wachstumsbedingungen der Bakterien in einem Testsystem und den realen Umgebungsparametern zu finden. Würde man das Testsystem auf die realen Umgebungsparameter des Stratum corneum anpassen, so würden die Bakterien sehr langsam oder aber überhaupt nicht wachsen und es wäre nahezu unmöglich, die aus dem Stratum corneum isolierten Stoffe zu testen. Ist das Testsystem hingegen auf die optimalen Wachstumsbedingungen der zu testenden Bakterien angepasst, so kann es sein, dass unter diesen Bedingungen die antimikrobiellen Eigenschaften der aus dem Stratum corneum isolierten Stoffe nicht detektiert werden können. Es zeigte sich, dass bei einem für die Haut physiologischen pH-Wert von 5,5 die antimikrobielle Aktivität der untersuchten Proteine und Peptide meist höher als bei einem pH-Wert von 7,3 ist (Abb. 43). Der Einfluss des pH-Wertes auf die antimikrobielle Aktivität ist bereits mehrfach für histidinhaltige antimikrobielle Peptide wie z. B. Histatin, Azurocidin₂₀₋₄₄ und Clavanin beschrieben worden (Lee et al., 1997; MacKay et al., 1984; Pereira et al., 1993). Der Salzgehalt beeinflusst die antimikrobielle Aktivität ebenfalls. So zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 100 mM NaCl keine antimikrobielle Aktivität des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ mehr vorhanden war (Tab. 10). Die Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von der NaCl-Konzentration konnte für hBD-1 bei Patienten mit Mukoviszidose und für hBD-2 sowie Cathelicidine gezeigt werden (Bals et al., 1998; Goldman et al., 1997; Travis et al., 2000). Diese Beeinflussung der antimikrobiellen Aktivität könnte auch einen Schutzmechanismus darstellen, indem diese auf

die Bereiche mit einem niedrigen pH-Wert und einer niedrigen Salzkonzentration begrenzt wird (Lee et al., 1997). Der Einfluss unterschiedlicher Nährstoffquellen wurde ebenfalls im MDA untersucht. So zeigte sich, dass bei Verwendung von einem Prozent der beiden Vollmedien TSB und LB die antimikrobielle Aktivität am geringsten ist. Wird hingegen keine zusätzliche Nährstoffquelle oder aber nur 0,25 % Glukose als Kohlenstoffquelle zugegeben, so ist die antimikrobielle Aktivität höher als bei Verwendung der beiden Vollmedien (Abb. 43). Eine mögliche Ursache könnten anionische Peptide in den beiden Vollmedien sein, die mit den kationischen Hornerinfragmenten interagieren und so die antimikrobielle Aktivität reduzieren (Steinberg und Lehrer, 1997). Eine andere Erklärung wäre die Anpassung des Stoffwechsels der Bakterien an die Verfügbarkeit von Nährstoffen. Für *Mycobacterium tuberculosis* ist eine Abhängigkeit der Wachstumsinhibition durch Pyrimidinimidazole von der verwendeten Kohlenstoffquelle beschrieben worden (Pethe et al., 2010). Das optimale Medium für die antimikrobielle Testung wäre eine Lösung mit den Bestandteilen des Stratum corneums ohne die antimikrobiellen Faktoren.

Um erste Hinweise auf Zielstrukturen der Hornerinfragmente in den Bakterien und dem Hefepilze *C. albicans* zu erhalten, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen Hornerin-behandelter Mikroorganismen durchgeführt. Das auffälligste Merkmal in den so behandelten Mikroorganismen sind Veränderungen im Zytoplasma in Form von großen elektronendichten und elektronendurchlässigen Bereichen (Abb. 44). Dies könnte auf eine Interaktion des Hornerins mit den Ribosomen der Mikroorganismen hindeuten, die dann zu einer Verklumpung führen. Eine Behandlung mit dem bakteriziden Translationshemmer Gentamicin, der irreversibel an die 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms bindet und so die Proteinbiosynthese beeinflusst (Schröder et al., 2000), induziert vergleichbare Veränderungen in *P. aeruginosa* (Abb. 54 im Anhang). Dabei kommt es zu Fehlern in der Translation, die über mehrere Zwischenschritte zur Generierung von Hydroxylradikalen (Kohanski et al., 2008), zu Merkmalen des programmierten bakteriellen Zelltodes wie DNA-Fragmentierung und Phosphatidylserinexposition (Dwyer et al., 2012) und zum Zelltod führen (Dwyer et al., 2014; Lobritz et al., 2015). Ein Literaturvergleich der Ultrastruktur von mit antimikrobiellen Peptiden behandelter Bakterien mit der Ultrastruktur Hornerin-behandelter Bakterien ergab keine Übereinstimmung der beobachteten Veränderungen. Allerdings gibt es keine systematischen Untersuchungen zu den Auswirkungen von AMPs, Antibiotika und anderen antimikrobiellen Faktoren auf die Ultrastruktur von Mikroorganismen, bei denen die

Inkubationsbedingungen, die Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie sowie die Zeitpunkte der Fixierung konstant gehalten wurden. Für hBD-3 konnte gegenüber *S. aureus* nach 30 min die Ausbildung zusätzlicher Septen (Sass et al., 2010) und nach 2 h eine Perforation der Zellwand (Harder et al., 2001), gegenüber *E. coli* konnte nach 30 bis 60 min Bläschenbildung der Membran (Wilmes und Sahl, 2014) und gegenüber *C. difficile* konnte nach 4 h eine Störung in der Membranintegrität nachgewiesen werden (Nuding et al., 2014). Für synthetisches HNP-1 konnte gegenüber *S. aureus* bei Protoplasten nach 20 min ein Aufbrechen der inneren Zellmembran und nach 2 h die Bildung von Mesosomen festgestellt werden (Shimoda et al., 1995). Für Dermcidin konnte gegenüber *S. aureus* nach 4 h eine Bindung an die Oberfläche der Bakterien und eine zelluläre Desintegration, aber keine Schädigung der Zellwand beobachtet werden (Steffen et al., 2006). Eine zweistündige Behandlung mit dem Cathelicidin LL-37 führte bei *P. aeruginosa* zu Störungen und Brüchen in der Zellmembran sowie zum Verlust von intrazellulärem Material (Andersson et al., 2004). Reduziertes hBD-1 bewirkte bei *Bifidobacterium adolescentis* nach 2 h einen Verlust des Zytoplasmas (Schröder et al., 2011). Das reduzierte alpha-Defensin HD-6 führte dagegen bei *Bifidobacterium adolescentis* nach 30 min zu einer Desintegration intrazellulärer Strukturen ohne Bläschenbildung oder Störungen in der Membranintegrität (Schröder et al., 2014). Die mit reduziertem HD-6 behandelten Bakterien weisen eine strukturelle Ähnlichkeit mit den Hornerin-behandelten Bakterien auf, was auf ähnliche Wirkmechanismen der strukturell unterschiedlichen antimikrobiellen Peptide hindeuten könnte. So scheint neben der Beeinflussung der Membranintegrität auch der bakterielle Metabolismus in Form der Synthese von Proteinen, Nukleinsäuren oder der Zellwand ein Ziel von antimikrobiellen Peptiden zu sein (Brogden, 2005). Darüber hinaus kann auch der programmierte bakterielle Zelltod beeinflusst werden (Lee und Lee, 2015). Eine Klärung des genauen bakteriellen Wirkmechanismus des Hornerins muss zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die klassischen humanen AMPs sind mit wenigen Ausnahmen, wie dem Dermcidin (pI 6,1) oder dem Psoriasin (pI 6,25), kationische Peptide (Zhao et al., 2013). Hornerin als Gesamtmolekül weist einen pI von 10,04 auf. Das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ ist mit einem pI von 11,91 wesentlich basischer. Die Nettoladung liegt bei einem pH von 7,3 bei +9 und bei einem pH von 5,5 bei +18. Somit kann das rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ der Gruppe der kationischen Peptide zugeordnet werden. Im Vergleich dazu hat hBD-2 einen pI von 9,3 (Nettoladung bei pH 7,3: +5 und bei pH 5,5: +7) und LL37 einen pI von 10,61 (Nettoladung bei pH 7,3 und 5,5: +6). Die enzymatisch

aktiven AMPs weisen pI-Werte von 9,83 für RNase 7 (Nettoladung bei pH 7,3: +16 und bei pH 5,5: +22), 10,55 für Granulysin (Nettoladung bei pH 7,3 und 5,5: +6) und 9,28 für Lysozym (Nettoladung bei pH 7,3: +7 und bei pH 5,5: +9) auf (Gasteiger et al., 2005). Das Hornerin ist mit 2850 Aminosäuren sehr viel länger als die klassischen antimikrobiellen Peptide oder Proteine (Wang, 2015). Im Vergleich von humanen AMPs markiert der antimikrobiell aktive Teil des Histons H2B mit 12 Aminosäuren den unteren Bereich und RNase 7 und Lysozym begrenzen mit 130 Aminosäuren den oberen Bereich der Länge der AMPs, wobei klassischerweise bis zu einer Länge von 99 Aminosäuren von Peptiden, darüber hinaus von Proteinen gesprochen wird (Boman, 1995). Es gibt aber auch beschriebene AMPs von 356 (Peptidoglycan recognition protein 4) oder 456 (Bactericidal permeability-increasing protein) Aminosäuren (Wang et al., 2009). Das Hornerin ist aufgrund seiner Zusammensetzung aus ca. 94 % repetitiven Einheiten in seiner Struktur mit keinem der bisher beschriebenen AMPs vergleichbar. Auffällig ist, dass die repetitiven Einheiten innerhalb eines Hornerinmoleküls eines Individuums ähnlich aber nicht identisch sind und bei interindividuellen Vergleichen viele SNPs innerhalb der repetitiven Einheiten nachgewiesen werden konnten (Abb. 53). Über die mögliche Funktion der repetitiven Einheiten kann bisher aber nur spekuliert werden. Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz der repetitiven Einheiten könnten Schnittstellen für diverse humane und/oder bakterielle Proteasen darstellen, so dass Fragmente verschiedenster Länge entstehen die zusammen mit den Unterschieden in der Aminosäuresequenz vielfältige Spezifitäten in der antimikrobiellen Aktivität bedingen könnten. Das umfangreiche Arsenal an verschiedensten Peptiden könnte in seiner Gesamtheit in der Lage sein, auch auf Mikroorganismen zu reagieren, die dem Organismus vorher noch nicht begegnet sind. Die proteolytische Freisetzung von diversen antimikrobiellen Peptiden konnte für das Protein C3 des Komplementsystems schon nachgewiesen werden (Nordahl et al., 2004).

Für einige AMPs wurden posttranslationale Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung, Amidierung oder Glykosylierung beschrieben (Bahar und Ren, 2013), die für ihre antimikrobielle Wirkung von entscheidender Bedeutung sind. In den humanen AMPs sind so weit bisher bekannt nur die Ausbildung von Disulfidbrücken (Ganz und Lehrer, 1994) oder die Öffnung von Disulfidbrücken (Schröder et al., 2011) z. B. in den Defensinen und die proteolytische Prozessierung z. B. des Cathelicidins (Shinnar et al., 2003) von Bedeutung. Die humanen β -Defensine enthalten mindestens 6 Cysteine (12 - 16 % aller Aminosäuren), die

dann drei Disulfidbrücken bilden und so die Struktur stabilisieren (Pazgier et al., 2006). Im Gegensatz dazu sind in der Hornerinsequenz nur 16 Cysteine vorhanden (0,6 % aller Aminosäuren), die sich über das gesamte Molekül verteilen (Abb. 52) so dass intramolekulare Disulfidbrücken als unwahrscheinlich erachtet werden können, was auch anhand bioinformatischer Analysen bestätigt wird (Ceroni et al., 2006; Lin und Tseng, 2010; Murad und Singh, 2013). In unterschiedlichen Proteinextrakten epidermalen Ursprungs konnte über einen großen molekularen Massenbereich Hornerin-Immunreaktivität nachgewiesen werden (Henry et al., 2011; Takaishi et al., 2005; Wu et al., 2009b). Ob die für die Entstehung der Fragmente notwendige Spaltung des Hornerins durch endogene und oder exogene z. B. mikrobielle Proteasen erfolgt, konnte bisher nicht beantwortet werden. Eine vorab definierte Proteinstruktur scheint in Fragmenten des Hornerins für dessen antimikrobielle Aktivität nicht erforderlich zu sein (Abb. 32). Proteine, denen eine eindeutig definierte Tertiärstruktur unter nativen Bedingungen fehlt, werden als „intrinsically disordered proteins“ IDPs bezeichnet, und bilden eine relativ neu definierte Gruppe von Proteinen (Tomba, 2012a). Inzwischen ist auch für zwei AMPs eine solche Struktur als die antimikrobiell wirksame Form beschrieben worden. Für das im Darm vorkommende humane Alpha-Defensin-6 (HD-6) wurde bekannt, dass die reduzierte Form antimikrobielle Aktivität aufweist (Schröder et al., 2014). Das ebenfalls im Darm vorkommende hBD-1 wird unter reduzierenden Bedingungen ebenfalls linearisiert und ist dann antimikrobiell wirksam (Schröder et al., 2011). Für beide AMPs konnten in der antimikrobiell wirksamen reduzierten Form keine Sekundärstrukturen mehr nachgewiesen werden. Für einige AMPs wie das Melittin, die Hauptkomponente des Bienengifts, oder das bovine Indolicidin ist beschrieben, dass sie bei Interaktion mit ihrer jeweiligen Zielstruktur die Konformation ändern. Dabei wird das Melittin von einem Zufallsknäuel in wässriger Lösung in eine 70 %ige α -helikale Form nach Bindung an die Membran überführt (Vogel, 1981). Indolicidin ändert seine Faltung von einer globulären amphipatischen Konformation in eine keilförmige Struktur, sobald es mit einer Lipiddoppelschicht in Interaktion tritt (Rozek et al., 2000). Hornerin könnte über einen ähnlichen Mechanismus wirken, bei dem das Peptid oder Protein erst bei Interaktion mit seiner Zielstruktur die Konformation einnimmt, die für die Funktion notwendig ist. Ein weiteres Merkmal der amphipatischen AMPs sind die bis zu 60 % hydrophoben Aminosäuren in ihrer Sequenz (Tossi et al., 2000). Im Hornerin sind allerdings nur 4,8 bzw. 6,7 % inklusive Prolin hydrophobe Aminosäuren enthalten und diese sind auch wie die Cysteine über das

gesamte Molekül verteilt, so dass die Hydrophobizität des Hornerins nicht mit derjenigen klassischer AMPs vergleichbar ist. Aufgrund der Verteilung der hydrophoben Aminosäuren kann beim Hornerin, im Gegensatz zu den meisten AMPs, nicht von einem amphipatischen Molekül gesprochen werden. Für die AMP-typische Interaktion mit der bakteriellen Membran ist das amphipatische Verhalten von entscheidender Bedeutung (Fernandez-Vidal et al., 2007), so dass spekuliert werden kann, dass der antimikrobielle Wirkmechanismus des Hornerins ein anderer ist. Inzwischen werden drei Wirkmechanismen der AMPs anhand deren Zielstrukturen (bakterielle Zellwand, innere Membran und intrazelluläre Strukturen) unterschieden (Wang, 2014). Welche Zielstruktur das Hornerin hat konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Neben den antibakteriellen Eigenschaften der AMPs sind auch antivirale (Bastian und Schafer, 2001), antifungale (De Lucca und Walsh, 1999) und antiparasitäre (Mor, 2009; Pretzel et al., 2013) Wirkungen beschrieben. Die antibakteriellen Eigenschaften des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ wurden anhand der beiden gram-negativen Bakterien *E. coli*, *P. aeruginosa* und dem gram-positiven Bakterium *S. aureus* und die antifungalen Eigenschaften anhand von *C. albicans* nachgewiesen. Die Wirkung auf besonders resistente Bakterien wie *Serratia* oder *Burkholderia*, Bakterien und Pilze aus klinischen Isolaten oder auf antibiotikaresistente bakterielle Stämme muss späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Zusätzlich zu den antimikrobiellen Eigenschaften wurden weitere Funktionen für die AMPs beschrieben. Bisher konnten für 35 humane AMPs für Leukozyten chemotaktische Eigenschaften beschrieben werden, z. B. für die Defensine (Chertov et al., 1996; Territo et al., 1989) und das Cathelicidin LL-37, für das ein Apoptose-induzierender als auch unterdrückender Effekt, je nach biologischem Kontext beschrieben worden ist (Barlow et al., 2006; Chamorro et al., 2009). Weiterhin wurden für LL-37 und Histatin wundheilungsfördernde Eigenschaften in Form von Zellmigration und Zellproliferation nachgewiesen (Oudhoff et al., 2010). Für Hornerin konnte in eine Wundheilungsexperiment am 15. Tag in den Wundrändern erhöhte Proteinexpression nachgewiesen werden (Takaishi et al., 2005). Ob die oben beschriebenen Eigenschaften auch auf Fragmente des Hornerins zutreffen, muss zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

AMPs werden sowohl konstitutiv, wie z. B. RNase-7 (Harder und Schröder, 2002), Lysozym (Ogawa et al., 1971) und Dermcidin (Rieg et al., 2004), induzierbar, wie das hBD-2 (Harder et

al., 1997) und hBD-3 (Harder et al., 2001) als auch konstitutiv und induzierbar wie Psoriasin (Gläser et al., 2005) in der Haut gebildet. Ob die Expression von Hornerin durch mikrobielle Stimuli induzierbar ist, kann noch nicht abschließend beantwortet werden. Vor kurzem wurde aber gezeigt, dass durch Steinkohlenteer (van den Bogaard et al., 2013) und durch UV-Bestrahlung (Makino et al., 2014) Hornerin sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene induziert wird.

Es erscheint unrealistisch, davon auszugehen, dass kein Mikroorganismus in der Lage ist gegen einzelne AMPs resistent zu werden (Yeaman und Yount, 2003). Bei den Resistenzmechanismen werden konstitutive (passive) Mechanismen, die dauerhaft auch in der Abwesenheit des AMPs vorhanden sind, von induzierbaren (adaptiven) Mechanismen, die als Antwort auf das AMP oder den durch das AMP induzierten Stress ausgelöst werden, unterschieden. So bilden *Staphylococcus sp.* Membranen mit wenig negativen Ladungen aus und reduzieren so die Interaktion mit kationischen AMPs (Foster, 2005) und *P. aeruginosa* gibt in seine Umgebung proteolytische Enzyme ab und inaktiviert so AMPs (Koziel und Potempa, 2013; Schmidtchen et al., 2014). Inwieweit diese beiden bakteriellen Resistenzmechanismen das antimikrobielle Spektrum des rHRNR₂₅₉₁₋₂₆₈₄ beeinflussen, lässt sich bisher nicht beantworten.

Bis heute wurde dem Einfluss antimikrobieller Substanzen auf die Wuchsform der Mikroorganismen nur wenig Beachtung geschenkt. Bei Untersuchungen zum antimikrobiellen Mechanismus von AMPs stellt sich die Frage, ob es sich um bakteriostatische oder bakteriolytische Wirkungen handelt und ob unter Umständen von diesen Substanzen nur bestimmte Wuchsformen der Bakterien wie die Ausbildung von Biofilmen (Hall-Stoodley et al., 2004), von „Persister“-Zellen (Balaban et al., 2004) oder den „Small colony variants“ (Proctor et al., 1998) inhibiert werden. Darüber hinaus können auch die Zellkommunikation, das „Quorum Sensing“ (Kumar und Engelberg-Kulka, 2014) oder die Induktion des programmierten Zelltodes (Tanouchi et al., 2013) in Bakterien beeinflusst werden. Die Testung dieser Wachstumsbedingungen gehören nicht zum Standardarsenal der Untersuchungen neuer antimikrobieller Substanzen, so dass wahrscheinlich viele Substanzen mit der Fähigkeit, diese Wachstumsbedingungen zu beeinflussen, nicht erkannt werden. Inwieweit eine der oben genannten Wachstumsbedingungen durch Hornerin beeinflusst wird, müssen zukünftige Untersuchungen klären. Obwohl der Biofilm die bevorzugte Form im bakteriellen

Lebenszyklus ist, konnte auf gesunder Epidermis kein Biofilm nachgewiesen werden (Percival et al., 2012a). Bakterielle Biofilme findet man auf der Haut nur bei Abwesenheit einer intakten Epidermis wie z. B. bei Brandverletzungen oder einem Ulcus (Costerton et al., 1999; Kirketerp-Møller et al., 2011). Ob dieser Befund durch Substanzen aus der Epidermis oder aber durch die fortlaufende Erneuerung der Oberfläche bedingt ist, bedarf noch der Klärung. Natürlicherweise bilden sich im Körper Biofilme nur auf den Zähnen (Socransky et al., 1998), bei denen keine kontinuierliche Erneuerung der Oberfläche stattfindet. Ansonsten stellen Biofilme nur auf implantierten künstlichen Materialien mit statischer Oberfläche ein Problem dar (Francolini und Donelli, 2010).

Die erste Abwehrlinie der Epidermis ist eine Kombination aus den verschiedensten, das Bakterienwachstum inhibierenden, Faktoren und entfaltet erst in diesem Zusammenspiel ihre volle Wirkung. Als erstes ist dabei das Fehlen von freiem Wasser zu nennen. So befindet sich das beim transepidermalen Wasserverlust gemessene Wasser als Wasserdampf in der Gasphase. Die Bakterien können diesen Wasserdampf nur nutzen, wenn sie in der Lage sind, diesen Wasserdampf zu kondensieren. Wasser, das sich in flüssiger Form im Stratum corneum befindet (ca. 10-20 %) (Warner et al., 1988) ist an Strukturen und an wasserbindende Stoffe gebunden und steht den Bakterien nicht zur Verfügung (Inoue et al., 1986). Als zweites ist der pH-Wert von entscheidender Bedeutung. Der hautrelevante pH-Wert von ungefähr 5,5 (Schmid-Wendtner und Korting, 2006) wird durch die natürlichen Feuchtigkeitsfaktoren (NMFs) in Form freier Aminosäuren sowie der Pyrrolidincarbonsäure (PCA, Pyroglutamat), einem Abbauprodukt der Glutaminsäure, der Urocaninsäure (UCA), einem Abbauprodukt des Histidins, und dem Citrullin, dem Deiminationsprodukt des Arginins, zusammen mit den freien Fettsäuren (Fluhr et al., 2001), Laktat und Harnstoff bedingt (Parra et al., 2003). Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass der pH-Wert durch die bakterielle Besiedlung verbunden mit einem anaeroben und Säure-produzierenden Stoffwechsel beeinflusst wird (Lambers et al., 2006). Wie bereits gezeigt beeinflusst der pH-Wert das Wachstum der Bakterien (Abb. 42) und spielt somit für die Abwehr ebenfalls eine Rolle (Lukacs, 1992). Als drittes Kriterium limitiert die Nährstoffverfügbarkeit auf der Epidermis das Wachstum der Mikroorganismen (Brown et al., 2008; Holland, 1993). Sind die bisher genannten Mechanismen nur in der Lage, bakteriostatisch aber nicht bakteriolytisch zu wirken, so kann der Mechanismus der Desquamation, also der kontrollierte Verlust der obersten Schichten des Stratum corneums, an dem die Bakterien anhaften, dazu beitragen die in Stase

befindlichen Bakterien von der Oberfläche zu entfernen. Sollten Mikroorganismen trotz der bereits genannten Mechanismen in der Lage sein, aktiven Stoffwechsel zu betreiben und in das Stratum corneum einzudringen, so sind dafür Proteasen notwendig, um die proteinogenen Bestandteile der Barriere zu überwinden und Nährstoffquellen zu erschließen. An dieser Stelle könnte das Hornerin von Bedeutung sein. Werden durch die bakteriellen Proteasen Fragmente aus dem Hornerin geschnitten, so werden erst dadurch die antimikrobiellen Faktoren gebildet, die in dem großen Hornerinmolekül präformiert, aber möglicherweise noch nicht aktiv sind. Dieses könnte ein Mechanismus sein, um Resistenzen zu vermeiden, da die aktiven Stoffe erst gebildet werden, wenn die Mikroorganismen versuchen die Barriere zu durchbrechen. Der Vorteil dabei wäre, dass die Generierung von antimikrobiellen Faktoren unabhängig von lebenden humanen Zellen erfolgt, die Faktoren nicht dauerhaft in ihrer aktiven Form vorliegen und, gebunden an strukturbildende Bestandteile, vor Verlust durch Abwaschen geschützt sind.

Welche Rolle die Kommensalen in diesem Zusammenhang spielen, ist eine Frage, die von sehr großem Interesse wäre. Eventuell generieren bestimmte Bakterien aufgrund ihrer proteolytischen Fähigkeiten Hornerinfragmente, die dann Bakterien abtöten können. Diese Hornerinfragmente können dann sowohl auf das proteolytisch aktive Bakterium zurück als auch auf andere Kommensale oder Pathogene wirken. Neben den bereits genannten Faktoren könnten antimikrobielle Lipide (Bratt et al., 2011), die im Stratum corneum vorkommen, als zusätzliche Faktoren eine Rolle spielen. Bei den bis heute durchgeführten Untersuchungen wird den additiven Effekten der verschiedenen Mechanismen und Faktoren nur am Rand Beachtung geschenkt, und das obwohl eine isolierte Betrachtung hinsichtlich der Situation *in vivo* wenig sinnvoll ist. Erste Untersuchungen hinsichtlich dieser additiven Effekte hat es bereits in einem System aus Nisin, einem Lantibiotikum aus dem Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis*, und verschiedenen klassischen Antibiotika gegeben (Naghmouchi et al., 2012). Werden mikrobielle Bestandteile durch entsprechende Rezeptoren in den lebenden Zellen der Epidermis detektiert, so können in der Folge unter anderem antimikrobielle Peptide exprimiert werden. Diese können selbst antimikrobiell wirken, aber auch in Form von Botenstoffen (auch Alarmine genannt (Niyonsaba et al., 2007; Oppenheim und Yang, 2005)) zur Rekrutierung der zellulären Immunität beitragen. Somit entsteht ein gestaffeltes System von Abwehrlinien, die alle aufeinander aufbauen, miteinander vernetzt und voneinander abhängig sind. In Bezug auf diese Informationen stellt sich die Frage, wieso neue Antibiotika

oder auch von AMPs abgeleitete synthetische Peptide keine Resistenzen hervorrufen sollten, wenn diese in gleicher Weise, also als Einzelsubstanz, wie die bereits auf dem Markt befindlichen Antibiotika eingesetzt werden. Alle bisher auf den Markt gebrachten Substanzen zeigten schon bei ihrer Markteinführung oder kurze Zeit danach erste Resistenzen (Lewis, 2013). Die Entwicklung antimikrobieller Resistenz scheint also nicht ein intrinsisches Problem der antimikrobiellen Substanzen sondern ein Problem ihrer Anwendung zu sein.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde lassen vermuten, dass die Haut des Menschen über ein weiteres, lokal agierendes Abwehrsystem verfügt, bei dem das „S100 fused type“-Protein Hornerin eine wichtige Rolle spielen könnte. Dessen strategisch günstige Lokalisation im Stratum corneum und dessen hohe Empfindlichkeit gegenüber Proteasen könnte zur Freisetzung einer sehr umfangreichen Zahl antimikrobiell aktiver Peptidfragmente unterschiedlicher Sequenz und Größe führen, die in Kombination miteinander oder auch in Kombination mit anderen AMPs oder antimikrobiell aktiven Lipiden vielleicht eine hochwirksame Barriere gegenüber einer mikrobiellen Invasion darstellen.

Zukünftige Untersuchungen könnten zum Ziel haben, dieses neue Abwehrsystem der gesunden Haut für therapeutische Zwecke zu nutzen, beispielsweise durch artifizielle Induktion des Hornerins in Epithelzellen (wie es durch Teerprodukte schon gelungen ist (van den Bogaard et al., 2013)) oder durch Synthese antimikrobiell aktiver kleiner Hornerin-Peptidfragmente.

7 Zusammenfassung

Trichohyalin-like1 und Hornerin gehören zu den 7 Mitgliedern der S100 fused type Proteine, die hauptsächlich in der Haut und den Hautanhangsorganen exprimiert sind. Bekannteste Mitglieder sind Filaggrin und Trichohyalin. Die Proteine dieser Familie bestehen aus einer Amino-terminalen S100-Domäne, die 2 Ca^{2+} -bindende EF-Hand-Domänen beinhalten, gefolgt von einem Amino-terminalen „Spacer“ und einer unterschiedlichen Anzahl verschiedener Sequenzwiederholungen sowie dem Carboxy-terminalen Ende.

Trichohyalin-like1-Reaktivität konnte immunhistochemisch durch im eigenen Labor generierte polyklonale Antikörper im distalen Teil der inneren Haarwurzelscheide detektiert werden. Der immunologische Nachweis des natürlichen Proteins in Extrakten aus Gesamthaut, Epidermis, Kallus oder isolierten Haarwurzeln konnte mittels Western-Blot-Analysen nicht erbracht werden. Als mögliche Ursachen konnten *in vitro* die enzymatische Umwandlung der Arginine in Citrulline oder die enzymatische Ausbildung von Isopeptidbindungen und die damit verbundene Veränderung der Antigenität sowie die durch die Kreuzvernetzung erschwerte Extraktion ausgemacht werden. Antimikrobielle Aktivitäten ließen sich für die 4 im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Protein-Fragmente des Trichohyalin-like1 im Radialdiffusionstest (RDA) nur in geringem Ausmaß gegen *E. coli* ATCC 11303 und *B. megaterium* ATCC 14581 nachweisen.

Die rekombinante Expression von verschiedenen Fragmenten des 2850 Aminosäuren langen Hornerins erwies sich anfangs aufgrund der proteolytischen Empfindlichkeit als großes Problem und Herausforderung. Durch Verwendung des pSumo3-Expressionssystems gelang zwar eine erfolgreiche Expression verschiedener Proteinfragmente des Hornerins, jedoch nicht die Generierung von Protein-Fragmenten mit mehr als 125 Aminosäuren. Struktur-Analysen unterschiedlicher Peptide aus dem Bereich des Hornerin₂₅₇₆₋₂₇₀₇ mittels CD-Spektroskopie wiesen auf eine hohe Flexibilität und die Abwesenheit typischer Sekundärstrukturelemente hin. Hornerin wurde anhand von bioinformatischen Berechnungen und den Ergebnissen aus der CD-Spektroskopie der Gruppe der „intrinsically disordered proteins, IDPs“ zugeordnet. Diese Zuordnung wurde durch die Aminosäurezusammensetzung des Gesamtmoleküls und IDP-spezifische Eigenschaften wie die verlangsamte Migration in der SDS-PAGE, die verringerte Denaturierung bei 100°C und die erhöhte Proteolyseempfindlichkeit unterstützt. Der Vergleich der Empfindlichkeit gegenüber humanen Proteasen des citrullinierten mit dem nicht modifizierten Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ zeigte

eine Veränderung für 8 der 15 untersuchten Proteasen. Für 3 Hornerin-Fragmente aus den repetitiven Einheiten und für das Carboxy-terminale Fragment konnte antimikrobielle Aktivität im Radialdiffusionstest (RDA) gegen *E. coli* ATCC 11775 und *P. aeruginosa* ATCC 10145 und für das Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ gegen *C. albicans* ATCC 24433 gezeigt werden. Eine Analyse der Rolle bestimmter Aminosäuren in der Proteinsequenz für die antimikrobielle Aktivität zeigte, dass die 4 aromatischen und langkettig aliphatischen Aminosäuren im Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ einen Einfluss auf die Effektivität aber nicht auf die Potenz der Empfindlichkeit haben. Der Einfluss der Arginine wurde anhand der enzymatischen Umwandlung in Citrullin untersucht. Im RDA konnte bei pH 7,3 und 5,5 für *E. coli* ATCC 11303 und für *P. aeruginosa* ATCC 10145 ein vollständiges Fehlen der antimikrobiellen Aktivität für das citrullinierte Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSumo3-Fusionsprotein detektiert werden. Im Mikroverdünnungstest (MDA) zeigte das citrullinierte Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ nur gegen *E. coli* ATCC 11775 keine Aktivität mehr. Gegen *P. aeruginosa* ATCC 10145 änderte sich die Potenz, gegen *C. albicans* ATCC 24433 die Effektivität und gegen *S. aureus* ATCC 6538 konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Auch Teilfragmente des Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ mit nur 54 oder 29 Aminosäuren zeigten vergleichbare antimikrobielle Aktivitäten. Den größten Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der untersuchten Hornerinfragmente hatte die Salzkonzentration. So konnte im RDA mit 10 mM NaCl bereits ein erster Effekt und mit 100 mM eine vollständige Inhibition beobachtet werden. Im MDA zeigten sich bei dem hautphysiologischen pH-Wert von 5,5 deutliche Steigerungen der antimikrobiellen Aktivität. Wurde im MDA anstatt der üblichen 1 % Vollmedien (LB oder TSB) 0,25 % Glukose oder keine zusätzlichen Nährstoffe eingesetzt, zeigte sich eine deutliche Steigerung der antimikrobiellen Aktivität. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden elektronendichte Aggregate der Ribosomen bei *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 11775, *P. aeruginosa* ATCC 10145 und *C. albicans* ATCC 24433 nach Behandlung mit Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ detektiert. Bei den beiden gram-negativen Bakterienstämmen wurde eine Beeinflussung der äußeren Membran, nicht aber der inneren Membran beobachtet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass Hornerin eine wichtige Komponente des Haut-Abwehrsystems darstellt, das durch Generierung hochaktiver Proteinfragmente die gesunde Haut vor Infektionen schützt. Die artifizielle Induktion des Hornerins und die Nutzung von Hornerin-Fragmenten als Antiinfektiva könnten daher zukünftige Optionen für die Behandlung infektiöser Hauterkrankungen sein.

8 Summary

Trichohyalin-like1 and Hornerin are 2 of the 7 members of the S100 fused type proteins that are mainly expressed in skin and skin appendages. The best-known members are Filaggrin and Trichohyalin. S100 fused type proteins consist of an amino-terminal S100-domain, which include 2 Ca²⁺-binding EF-hand domains, followed by a amino-terminal "spacer" followed by variable number of different repeats and the carboxy-terminal end.

In immunohistochemistry Trichohyalin-like1 reactivity was detected by in-house generated and purified polyclonal antibodies in the distal part of the inner root sheath. The immunological detection of the natural protein isolated from whole skin, epidermis, callus or isolated hair follicles extracts by western blot analyses failed. The enzymatic conversion of arginine to citrulline by protein arginine deiminase 1 or the enzymatic formation of isopeptide bonds between glutamine and lysine by transglutaminase 1 results in an associated change in the antigenicity and a hindered extraction due to cross-linking *in vitro*. Antimicrobial activities were detected in the radial diffusion assay (RDA) only to a small extent against *E. coli* ATCC 11303 and *B. megaterium* ATCC 14581 for 4 different recombinant protein fragments of Trichohyalin-like1.

The recombinant expression of various fragments of the 2850 amino acid comprising Hornerin has been proved as a major problem and challenge initially due to proteolytic sensitivity. By using the pSumo3 expression system the production of various Hornerin protein fragments succeeded, but the generation of Hornerin protein fragments with more than 125 amino acids still failed. Structural analyses of different peptides of the Hornerin₂₅₇₆₋₂₇₀₇ by CD-spectroscopy indicate a high degree of flexibility and the absence of typical secondary structure elements. Based on bioinformatic calculations and the results of CD-spectroscopy Hornerin were assigned to the group of "intrinsically disordered protein, IDPs". This assignment was supported by the amino acid composition of the total molecule and IDP-specific properties such as a slower migration on SDS-PAGE, reduced denaturation at 100°C and increased proteolysis also to proteases that have no digestion sites within the protein. The comparison of the sensitivity to human proteases of the citrullinated Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ with the unmodified Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ showed a shift for 8 of the 15 studied proteases. Three Hornerin fragments derived from the repetitive units and a carboxyl-terminal fragment exhibited antimicrobial activity in the radial diffusion assay (RDA) against *E. coli* ATCC 11775 and *P. aeruginosa* ATCC 10145 and additionally against *C. albicans* ATCC 24433 for Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄. Site-

directed mutagenesis experiments of Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ revealed that the 4 long chain aliphatic and aromatic amino acids had no influence on the efficacy of antimicrobial activity but on its potency of sensitivity. The influence of arginine was analyzed by enzymatic conversion into citrulline. For *E. coli* ATCC 11303 and *P. aeruginosa* ATCC 10145, a complete absence of antimicrobial activity for the citrullinated Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄-pSumo3 fusion protein was detected in RDA at pH 7.3 and 5.5. In the micro dilution assay (MDA), Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ lacked activity only against *E. coli* ATCC 11775. Whereas against *P. aeruginosa* ATCC 10145 the antimicrobial potency changed, against *C. albicans* ATCC 24433 the efficacy was altered and against *S. aureus* ATCC 6538 no changes were observed. Even partial fragments of Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄ with only 54 or 29 amino acids were revealed to be antimicrobial active. Inhibition experiments showed that the investigated Hornerin fragments were sensitive towards increasing concentrations of NaCl with complete inhibition at 100 mM in the RDA. When the MDA assay was used, a significant increase of the antimicrobial activity was observed at the skin physiological pH of 5.5. Furthermore, antimicrobial activity of hornerin fragments was inhibited when the assay media contained nutrients in terms of 1% complete media as LB or TSB. Ultrastructural analyses of Hornerin₂₅₉₁₋₂₆₈₄-treated microbes exhibited electron-dense aggregates of ribosomes in *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 11775, *P. aeruginosa* ATCC 10145, and *C. albicans* ATCC 24433. In the two investigated gram-negative bacterial strains effects on the outer membrane, but none on the inner membrane were observed.

The results of this work suggest that Hornerin represents an important component of the skin defense system that protects healthy skin from infection by generating highly active protein fragments. The artificial induction of Hornerins and the use of Hornerin fragments as anti-infectives could therefore be future options for the treatment of infectious skin diseases.

9 Anhang

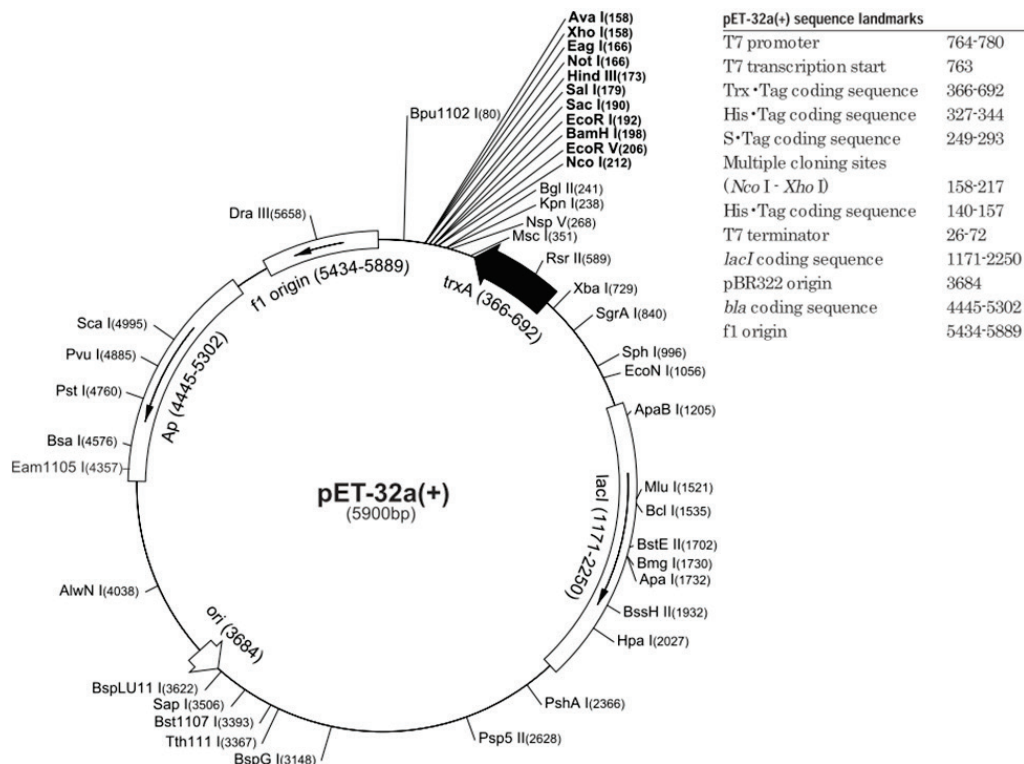


Abb. 45: Schematische Darstellung des pET32(a)-Vektors von Novagen. Eingezeichnet sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme und als Kästen bzw. Pfeile markiert verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Die Ausrichtung der Pfeile gibt die Orientierung der Gensequenz wieder. Ap: *bla*-kodierende Sequenz verantwortlich für die Ampicillin-Resistenz; *f1* origin: Replikationsursprung für *f1*-Phagen; *lacI*: *lacI*-kodierende Sequenz; *ori*: Replikationsursprung für *E. coli*; *trxA*: kodierende Sequenz für den Thioredoxin-Abschnitt. In der Liste mit den „sequence landmarks“ sind die Sequenzabschnitte genau bezeichnet. (Aus: pET system manual, 11th edition, Novagen)

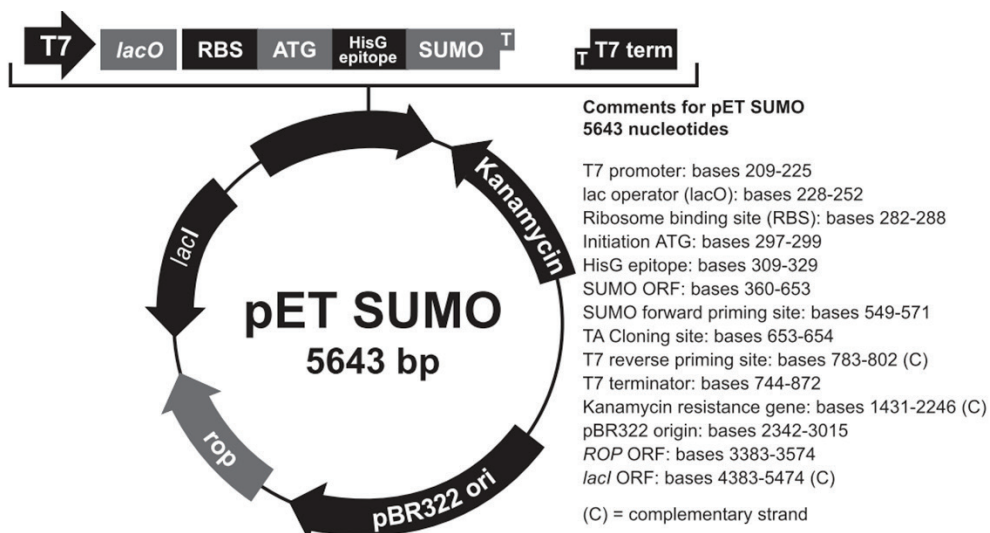


Abb. 46: Schematische Darstellung des pET-SUMO-Vektors von Invitrogen. Eingezeichnet sind als Kästen bzw. Pfeile verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Die Ausrichtung der Pfeile gibt die Orientierung der Gensequenz wieder. In der Liste mit den „Comments for pET SUMO“ sind die Sequenzabschnitte mit ihrer Position genau bezeichnet. (Aus: Champion TM pET SUMO Expression System manual, Invitrogen)

pSUMO3 vector is linearized with BsaI and BamHI restriction enzyme

pSUMO3 vector is linearized with BsaI and BamHI restriction enzyme

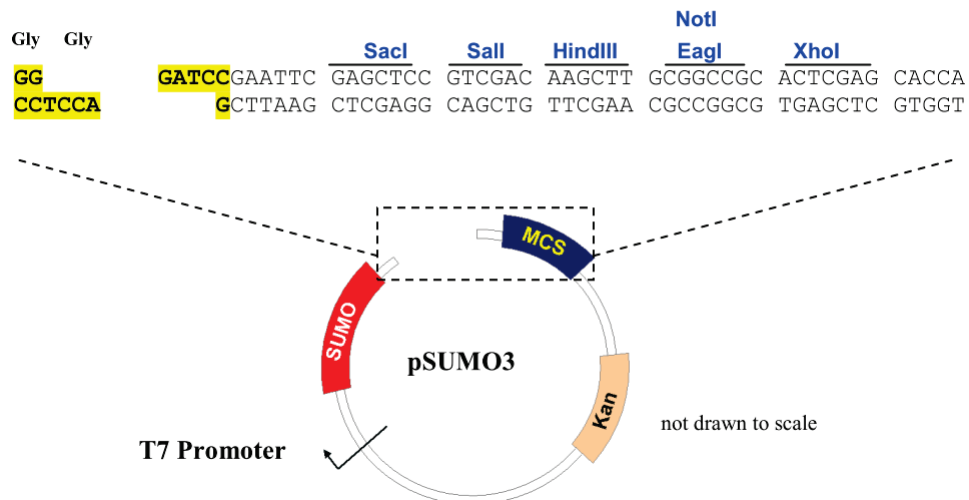


Abb. 47: Schematische Darstellung des pSUMO3-Vektors von LifeSensors. Eingezeichnet sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme und als Kästen verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Kan: Gen für Kanamycin-Resistenz; MCS: "Multiple Cloning Site"; SUMO: SUMO-Gensequenz. (Aus: Polylinker map (pSUMO3 vector, T7 Kan), LifeSensors)

pE-SUMO3 vector has to be linearized with BsaI or Eco31I restriction enzyme

pE-SUMO3 vector has to be linearized with BsaI or Eco31I restriction enzyme

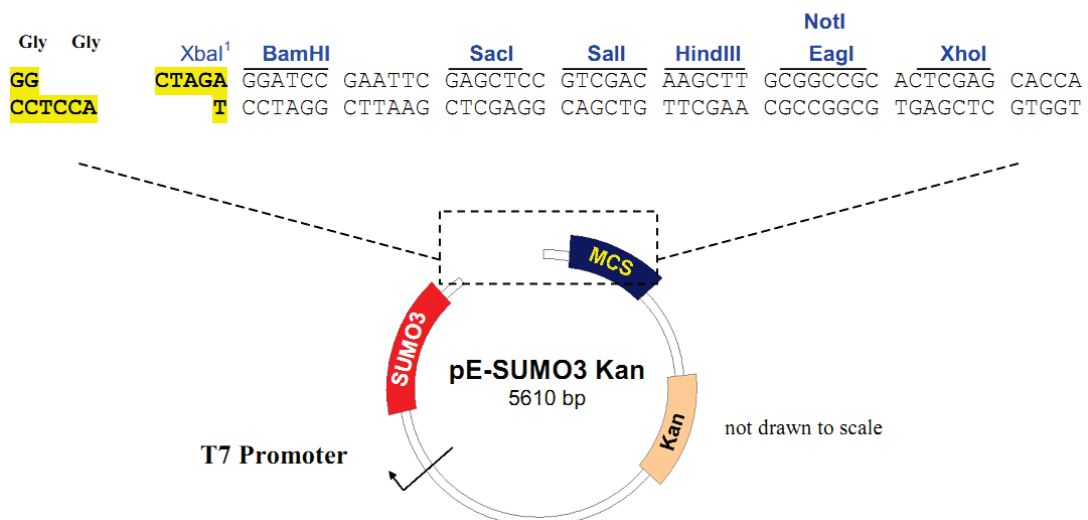


Abb. 48: Schematische Darstellung des pE-SUMO3-Vektors von LifeSensors. Eingezeichnet sind Schnittstellen der Restriktionsenzyme und als Kästen verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Kan: Gen für Kanamycin-Resistenz; MCS: "Multiple Cloning Site"; SUMO3: SUMO3-Gensequenz. (Aus: Polylinker Map (pE-SUMO3 Vector, T7, Kan), LifeSensors)

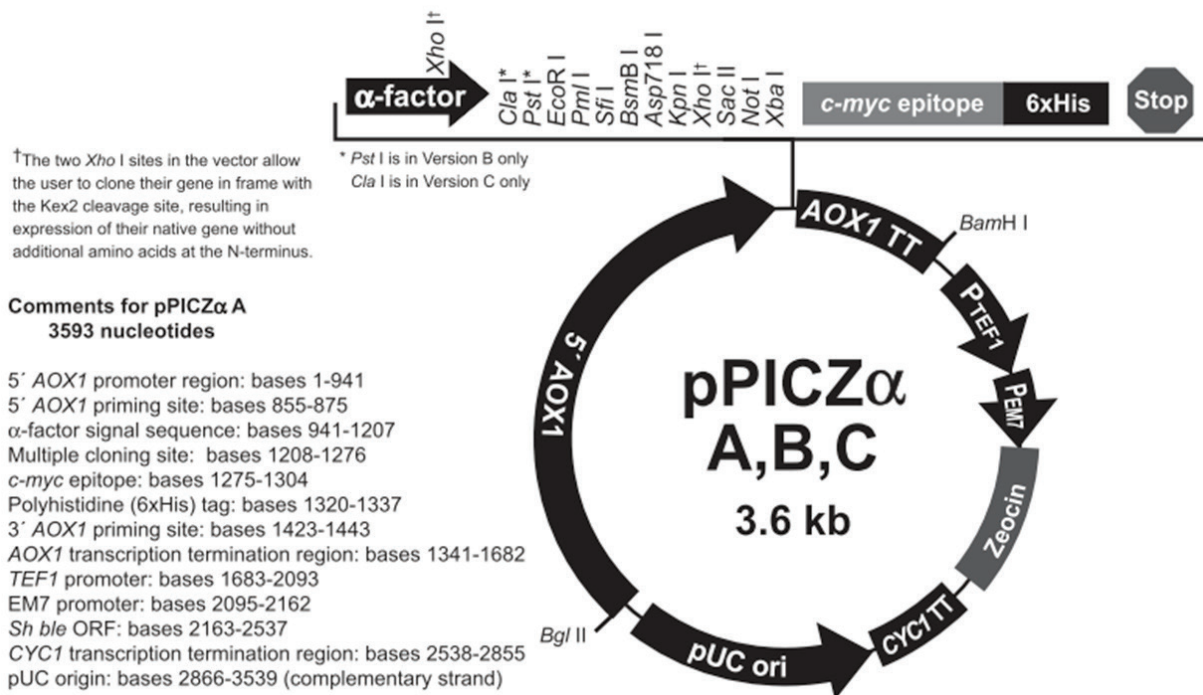


Abb. 49: Schematische Darstellung des pPICZα-Vektors von Invitrogen. Eingezeichnet sind als Kästen bzw. Pfeile verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Die Ausrichtung der Pfeile gibt die Orientierung der Gensequenz wieder. Zeocin: Gen für die Zeocin-Resistenz (als *Sh ble* bezeichnet). In der Liste mit den „Comments for pPICZαA“ sind die Sequenzabschnitte mit ihrer Position genau bezeichnet. (Aus: pPICZα A, B, and C user manual, Invitrogen)

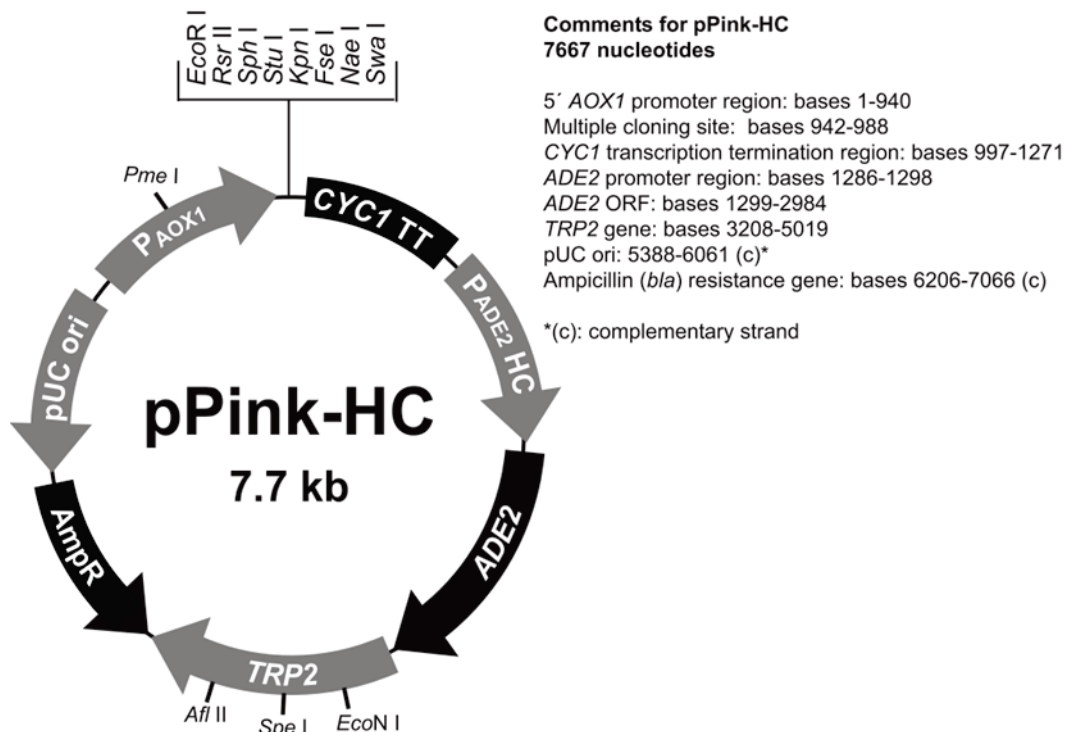


Abb. 50: Schematische Darstellung des pPink-HC-Vektors von Invitrogen. Eingezeichnet sind als Kästen bzw. Pfeile verschiedene, für die Verwendung wichtige Sequenzabschnitte. Die Ausrichtung der Pfeile gibt die Orientierung der Gensequenz wieder. ApmR: Gen für die Ampicillin-Resistenz (*bla*). In der Liste mit den „Comments for pPink-HC“ sind die Sequenzabschnitte mit ihrer Position genau bezeichnet. (Aus: PichiaPink Expression System User Guide, Invitrogen)

Tab. 11: Ergebnis der Suche nach Sequenzähnlichkeiten zum humanen TCHHL1. Die humane TCHHL1-Sequenz wurde mit den Einträgen in der ensembl-Datenbank verglichen. Die Tabelle gibt nur die Sequenzähnlichkeit innerhalb der Säugetiere wieder. Die Angabe der Identität zum humanen TCHHL1 in Prozent entspricht der bei dem Vergleich errechneten „Target %id“. Die unter der ensembl-Identifizierungsnummer angegebene Proteinsequenz wurde in ProtParam eingegeben und die ausgegebene molekulare Masse die Anzahl der Aminosäuren sowie der isoelektrische Punkt in der Tabelle notiert. Bei den mit einem Fragezeichen markierten Eigenschaften konnte aufgrund einer nicht eindeutigen Aminosäuresequenz keine Aussage zu der Masse oder dem isoelektrischen Punkt gemacht werden.

| Spezies | ensembl Identifizierungs- nummer | molekulare Masse [kDa] | Anzahl Amino- säuren | Isoelektrischer Punkt | Identität zum humanen TCHHL1 |
|--|--|---------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Mensch (<i>Homo sapiens</i>) | ENSG00000182898 | 99,27 | 904 | 4,62 | 100 % |
| Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>) | ENSPTRG00000001305 | 99,09 | 904 | 4,65 | 98 % |
| Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>) | ENSGGOG00000012074 | 99,25 | 904 | 4,75 | 97 % |
| Nördlicher Weißswangen-Schopfgibbon (<i>Nomascus leucogenys</i>) | ENSNLEG00000010326 | 99,27 | 904 | 4,70 | 93 % |
| Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>) | ENSMMUG00000020209 | 98,92 | 899 | 4,56 | 89 % |
| Orang-Utan (<i>Pongo pygmaeus</i>) | ENSPPYG00000010637 | 64,29 | 587 | 4,70 | 89 % |
| Weißbüschelaffe (<i>Callithrix jacchus</i>) | ENSCJAG00000006396 | 99,54 | 902 | 4,67 | 84 % |
| Grauer Mausmaki (<i>Microcebus murinus</i>) | ENSMICG00000012012 | ? | 851 | ? | 62 % |
| Elefant (<i>Loxodonta africana</i>) | ENSLAFG00000011588 | 71,04 | 652 | 4,67 | 62 % |
| Schwein (<i>Sus scrofa</i>) | ENSSSCG00000006609 | 98,19 | 887 | 4,68 | 60 % |
| Alpaka (<i>Vicugna pacos</i>) | ENSVPAT00000000100 | 95,44 | 876 | 4,71 | 60 % |
| Philippinen-Koboldmaki (<i>Tarsius syrichta</i>) | ENSTSYG00000002867 | ? | 856 | ? | 60 % |
| Mausohrfledermaus (<i>Myotis lucifugus</i>) | ENSMLUT00000013901 | 86,96 | 791 | 4,54 | 60 % |
| Panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>) | ENSAMET00000004626 | 100,17 | 908 | 4,72 | 59 % |
| Frettchen (<i>Mustela putorius furo</i>) | ENSMPUG00000003502 | 100,12 | 902 | 4,65 | 59 % |
| Hund (<i>Canis familiaris</i>) | ENSCAFG00000012944 | 100,36 | 905 | 4,70 | 58 % |
| Katze (<i>Felis catus</i>) | ENSFCAG00000022471 | 97,50 | 883 | 4,92 | 58 % |
| Rind (<i>Bos taurus</i>) | ENSBTAG00000015854 | 95,80 | 872 | 4,74 | 58 % |
| Neunbinden-Gürteltier (<i>Dasypus novemcinctus</i>) | ENSNOG00000015095 | 63,06 | 569 | 4,66 | 58 % |
| Hoffmann-Zweifingerfaultier (<i>Choloepus hoffmanni</i>) | ENSCHOG00000000880 | ? | 863 | ? | 56 % |
| Nördliche Spitzhörnchen (<i>Tupaia belangeri</i>) | ENSTBEG00000016356 | ? | 726 | ? | 56 % |
| Wildkaninchen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) | ENSOCUT00000004730 | 94,16 | 854 | 4,95 | 55 % |
| Hausmeerschweinchen (<i>Cavia porcellus</i>) | ENSCPOT00000011461 | 92,17 | 824 | 5,01 | 53 % |
| Ord-Kängururatte (<i>Dipodomys ordii</i>) | ENSODORT00000009436 | 84,51 | 751 | 4,90 | 52 % |
| Amerikanischer Pfeifhase (<i>Ochotona princeps</i>) | ENSOPRT00000017195 | 96,54 | 862 | 5,32 | 50 % |
| Hausmaus (<i>Mus musculus</i>) | ENSMUST00000029516 | 70,71 | 638 | 4,66 | 49 % |
| Waldspitzmaus (<i>Sorex araneus</i>) | ENSSART00000013335 | 97,87 | 874 | 4,94 | 47 % |
| Wanderratte (<i>Rattus norvegicus</i>) | ENSRNOT00000038311 | 69,37 | 625 | 4,79 | 46 % |
| Derbywallaby (<i>Macropus eugenii</i>) | ENSMEUG00000015153 | 95,88 | 847 | 4,50 | 32 % |
| Haus-Spitzmausbeutelratte (<i>Monodelphis domestica</i>) | ENSMODT00000024083 | 96,81 | 851 | 4,46 | 31 % |
| Tasmanischer Teufel (<i>Sarcophilus harrisii</i>) | ENSSHAT00000019683 | 96,51 | 851 | 4,22 | 30 % |

1 acagcccgctgccccacgtttctacctgctctcgcttggaactagcctctcctgagtttgtaaag
 ↳X³ 14-248 (235aa) 105-809 (705bp) **TCHHL1-K1**

66 atgcctcagctcctgagaaatgtcctctgtgtaattgagacattccacaatatgccaagtgaggacagtaacggggcaacactgactggcagagagctgaaacaa
 1 M P Q L L R N V L C V I E T F H K Y A S E D S N G A T L T G R E L K Q

171 ctcacccaggcgagtttggggaactttttcagccctgtgtccttcatgctgtggaaaaaattcaaatcttctgaatattgacagtaatggcatcatcagtttt
 36 L I Q G E F G D F F Q P C V L H A V E K N S N L L N I D S N G I I S F
 ↳X³ 90-248 (159aa) 333-809 (477bp) **TCHHL1-K2**

276 gatgaatttgttcttgcaatcttcaacttgttgaacctgttatcttgacataaaatcattactaagttctgaactaagacagggtgactaaaccagagaaggag
 71 D E F V L A I F N L L N L C Y L D I K S L L S S E L R Q V T K P E K E

381 aagctagatgatgtggatgttcaggcaaccaccggagatggtcagtgagcagtggaacttcaccaactcaagaaaaggagatgcttccttcagggaatggcatca
 106 K L D D V D V Q A T T G D G Q W T V G T S P T Q E K R M L P S G M A S

486 tcacctcagctcatccctgaagaaagtgaggcagttggaaataacagagtgaggccatggagagaagccaagactcacaactttccaggagaagcatctgaacac
 141 S S O L I P E E S G A V G N N R V D P W R E A K T H N F P G E A S E H

591 aatgatcctaagaacaaacacctggaaggagatgaacaaagtcaggaaagtggtcgaagatatacaaaacacagaagacaatgaaggccaacttaagacaaaatag
 176 N D P K N K H L E G D E Q S Q E V A Q D I Q T T E D N E G Q L K T N K

696 ccaatggcaggatcaaaaaagaccagcagtcaccacagagaggaaagggacagaataaggagatctccagggaaggagatgaaccagccagagagcaaaagtgtttcc
 211 P M A G S K K T S S P T E R K G Q D K E I S O E G D E P A R E Q S V S
 X³↳

801 aagataaagagaccagtttggagaacaggaagaaacttggcaacccaaagtccaccacaaaagaagcaacacaaagaccatgtgaagatcaggaagttagaaca
 246 K I R D Q F G E Q E G N L A T Q S S P P K E A T Q R P C E D Q E V R T

906 gaaaaggaaaaacactctaatatacaagaaccaccctcaaaagagaagatgagcccagttcacagcatgctgacctgccagaacaagctgctgccaggtcacca
 281 E K E K H S N I Q E P P L Q R E D E P S S Q H A D L P E Q A A A R S P

1011 tctcagacacagaaatcaactgattccaagatgtctgtagaatgtttgacactcaagaaccaggaaagatgctgaccagacaccagctaaacaaagaatttg
 316 S Q T Q K S T D S K D V C R M F D T Q E P G K D A D Q T P A K T K N L
 ↳X³ 369-784 (416aa) 1170-2417 (1248bp) **TCHHL1-K2**

1116 ggtgaacctgaggattatggcagaacatctgagaccacaagaaaaagaatgtgaaacaaaggacctgccagtcgaatattggtagcagaaatggttcagaaacatct
 351 G E P E D Y G R T S E T Q E K E C E T K D L P V Q Y G S R N G S E T S

1221 gacatgagagatgaaggaagagaggagaggtcctgaggccatggaacagcagggcagaaagaacgtgacagaaaaactcggccactagtccctggaacccaa
 386 D M R D E R K E R R G P E A H G T A G Q K E R D R K T R P L V L E T Q

1326 acacaggatgggaagtatcaggaaactcaagattatcaaaatcaaaagatgctgaaaaaggttctgagacacaatatctaagctcagaaggaggagatcagact
 421 T Q D G K Y Q E L Q G L S K S K D A E K G S E T Q Y L S S E G G D Q T

1431 cacctgaacttgaaggaacagcagctctcaggagaagaggcagaacacaccaaagaaggcacagcagaagcatttgtgaacagcaaaaacgcacctgcagcagaa
 456 H P E L E G T A V S G E E A E H T K E G T A E A F V N S K N A P A A E

1536 aggacactgggggcaagagaagaacacaaagatttagcaccacttgagaagcagctgttaggagaaaaatactagggtcaccagactcatgaccaaccagttgag
 491 R T L G A R E R T Q D L A P L E K Q S V G E N T R V T K T H D Q P V E
 I

1641 gaggaggatggttaccagggggaggacctgagtcaccattcacacagagtgatgaggggtctctgaaactcccaacagcctggcttcagaggaaggcaatagc
 526 E E D G Y Q G E D P E S P F T Q S D E G S S E T P N S L A S E E G N S

1746 agctcagagacaggtgaactgcctgtgcaaggggactcccagagtcagggggaccaacatggagagctgtgtgcaaggaggtcacaataataaccagataccag
 561 S S E T G E L P V Q G D S Q S Q G D Q H G E S V Q G G H N N N P D T Q

1851 aggcagggaacacctggtgagaaaaacagagctctggaggcagtggtaccagcagtcagaggagaggatgtacagctcacagaggaccagggaacagcctgccaga
 596 R Q G T P G E K N R A L E A V V P A V R G E D V Q L T E D Q E Q P A R

1956 ggagaacacagaatcaaggcccagggaagggccaggtgcagctgtggagcccaatggacaccagagaagcacaggaatccacagcaggagatgaaaataga
 631 G E H K N Q G P G T K G P A A V E P N G H P E A Q E S T A G D E N R

2061 aagtccttggaatatagatcacaggtgccttgatgaagacttcaactgaccagctttccctaatgcagctccctggaaggagatagcagaaatgaattaaag
 666 K S L E I E I T G A L D E D F T D Q L S L M Q L P G K G D S R N E K N

2166 gtccaaggcccaagtagcaaagaagagaaggaagagcaacagaggccagaataactctgttagaaagtctagatgaggacaattcagcctccctcaagatacaa
 701 V Q G P S S K E K E K A T E A Q N T L L E S L D E D N S A S L K I Q

2271 cttgaaacaaaggaacctgtaacatcagaggaggaagatgaaagtccccaagagctggcaggagaaggtggtgacaaaaaagtccagccaagaaagagcacaat
 736 L E T K E P V T S A G E D E S P Q E L A G A G E G G D Q K S P C A K E K E
 X³↳

2376 tcttcagtcctcctggtcaagtcttgaaaagcagatgcagagagaccaagagccctgttctgtggagaggggtgcagctctattccagtcactataccagtcacta
 771 S S V P W S S L E K Q M Q R D Q E P C S V E R G A V Y S S P L Y Q Y L

2481 caggagaagatactgcagcaaaacaaatgttaacccaagaggagcatcaaaagcaagttcagatagcccaggcatcaggcccagagcttttcagtgatccctcacc
 806 Q E K I L Q Q T N V T Q E E H Q K Q V Q I A Q A S G P E L C S V S L T

2586 agtgagatctcagattgttctgtcttttcaactacagccaagcatcacaaccatataccaggggacttccacttgatgagagtcctgctggtgcacaggaaca
 841 S E I S D C S V F F N Y S Q A S Q P Y T R G L P L D E S P A G A Q E T

2691 ccagctccccaggccttggaagataagcaaggtcaccctcagagagagaggtggtactacaaggagggaagcaccacaaagcaa tga 2780
 876 P A P Q A L E D K Q G H P Q R E R L V L Q R E A S T T K Q * (904aa)

2781 atcattatcatctcaacatgcccccaatttctctcccaatcaccctcaataactcacgtgtacacattcagatgcagattaacaatcttttaattctcttctcta
 2885 atttctacaaaaacaaataataataatttcagcagtggtgggacaccactaaagaacacatctgagcaaaacaaatacagtcagtaaaactcctccaaacaaatgct
 2989 acttccaaatgccccaaatgggctttgtcatgagacagtttatctcaatgtacctgtcatataaaatggaaaaatccttccatatctttgacaggtgcccagttt
 3093 ttccaactgattcattgaatttaaaatagagcagtaggaaattataagactctgcaataataatctcataatcataaaatattaattcatatataatagattactc
 3197 tgcctcagcatttccatagaagtatttcaagttcatctcaaaattttatccttcaaaataatttttagacaatgccataacttaattatgattttctagcactt
 3301 gattaaagtaaatattatgactctgctcatgttccaggtgcagctgaatctatgcgatggatcttcttcaattactcatccaacaaatttttatataatccc
 3405 actccttacacaaaacttttcatagcttttggctcaataaaacaatcaagaataattatgagagaaaaacacaaactctaaagtattgttattataagaagctc
 3509 ttgtaaccaaccatccagtgagctactaagttgtttacatatatggtttgatgaggggtatttaaattaaaattgataatttaacaacctgatgat 3603

Abb. 51: Für die rekombinante Expression ausgewählten Bereiche des TCHHL1. Der kodierende Bereich der cDNA ist durch die unterhalb der Sequenz dargestellte Proteinsequenz vom nicht-kodierenden Bereich der cDNA abgegrenzt. Das Startcodon atg ist in grün, das Stopcodon tga ist in rot gekennzeichnet. Die zu den verwendeten Primern komplementären Sequenzen sind orange markiert (die verwendeten Primer sind durch X¹) bis X⁵) abgekürzt). In der ersten Spalte sind sowohl die Nummerierung der cDNA (linksbündig) als auch der Aminosäuresequenz (rechtsbündig und kursiv) dargestellt. In der Aminosäuresequenz ist mit hellgrauem Hintergrund die „EF-hand-like“-Domäne gekennzeichnet und mit einer gepunkteten Umrandung ist die S100-Calcium-Bindungs-Domäne dargestellt. Unterstrichen sind die drei rekombinant erzeugten Proteine, deren Name oberhalb der Nukleotidsequenz genannt ist (angegeben sind die Positionen der Aminosäuren (aa) in der Gesamtsequenz des Proteins und auch die Positionen der Nukleotide (bp) in der Gesamtsequenz der cDNA). Zusätzlich sind die acht Cysteine durch eine gelbe Hintergrundfärbung kenntlich gemacht. Da die Cysteine möglicherweise Disulfidbrücken ausbilden, wurden diese Bereiche für die rekombinante Expression ausgespart.

| Bezeichnung | Sequenz | Anzahl der Aminosäuren | Molekulargewicht [Da] | Isoelektrischer Punkt pI |
|---|--|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| rHRNR ₂₅₇₆₋₂₇₀₇ | GFHHSSSSGQSSSYSQHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSLGHSSSHGQHGSGSRSSRGPFYPSRGHSSVFGQHESSGSHSSAY | 132 | 13105,1 | 10,83 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄ | SQHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSLGHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 94 | 9210,3 | 11,91 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄) ¹ | SOHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSGCHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 94 | 9154,1 | 11,91 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄) ² | SOHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSGCHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 94 | 9048,0 | 12,10 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄) ³ | SOHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSGCHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 94 | 8941,8 | 12,30 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₈₄) ⁴ | SOHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSGCHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 94 | 8835,7 | 12,54 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₆₂ | SOHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSGCHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 72 | 7059,1 | 11,88 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₃₇ | SOHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSGCHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 54 | 5365,3 | 11,44 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₁₈ | SOHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSGCHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 28 | 2814,8 | 10,74 |
| rHRNR ₂₅₉₁₋₂₆₀₉ | SOHGSGHSSGYGQHGSRSGQSSRGERHGSSSSSHYGYQHGSGSRQSSSHGHRQSGSGGQSPSRGRHGSGCHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 19 | 1869,8 | 8,53 |
| rHRNR ₂₆₃₈₋₂₆₈₄ | QSSGHGROSGSGGQSPSRGRHGSLGHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 47 | 4572,7 | 12,18 |
| rHRNR ₂₆₅₆₋₂₆₈₄ | GRHGSLGHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 29 | 2833,9 | 11,71 |
| rHRNR ₂₆₅₈₋₂₆₈₄ | HGSLGHSSSHGQHGSGSRSSRGPFY | 27 | 2620,7 | 10,84 |

Tab. 12: rekombinante Proteine aus dem Hornerin-Fragment 2576 bis 2707. mit)¹,)²,)³ und)⁴ sind die vier Fragmente, bei denen die Tyrosine und das Leucin in Glycin mutiert wurden, bezeichnet. Die ausgetauschten Aminosäuren sind durch rote Buchstaben gekennzeichnet.

1 accctgaaagctgtttctgtctctaccctacttgttctctgtgtgagctaggttactcaaaacttgcaaaaaaaaaa
 ↳ 1-102 (102aa) – 77 - 382 (306bp)

77 atgcttaaaactcctacaaggcgtcatcactgtcatcgatgttttctaccaatatgcccccagcatggggagtatgatacgttgaacaaggcagagctgaagaa
 1 M P K L L Q G V I T V I D V F Y Q Y A T Q H G E Y D T L N K A E L K E
 pAB (rabbit) (Fleming et al., 2012)

182 cttctggaaaatgagtttcatcaaatctgaagaatccaaacgatccagatactgtggatattcttgcaggctgagaccataacaagaaagtggat
 36 L L E N E F H Q I L K N P N D P D T V D I I L Q S L D R D H N K K V D
 Abnova PAB7432 pAB (goat)
 Anti-Hornerin1 pAB (goat)

287 ttactgagtattctctgatgatattcaagctgggtcaggctcgttaataaaatcattggcagaagattactgccaagtttcagggtcaaagctgagagatgacact
 71 F T E Y L L M I F K L V Q A R N K I I G K D Y C Q V S G S K L R D D T

392 caccagcaccaagaggaacaagaagaactgaaaaagaggagaacaaacggcgaagaatcctctttagtcattcaagttggagtgaggagagaatgattcctat
 106 H Q H Q E E Q E E T E K E E N K R Q E S S F S H S S W S A G E N D S Y
 Abnova PAB22558 pAB (rabbi)

497 tccagaaacgtcagaggaagtcttaaacctgggactgaatccataccagaagactgagtttcaaagagactttctggccaacataactcctactcaggtcag
 141 S R N V R G S L K P G T E S I S R R L S F Q R D F S G Q H N S Y S G
 t)

602 tttccagctatggtagcaaaactccgactcccatcagttctcaggccggcgccaatgtgggtctgggtcagggcagttctcccaactatggccaacacggctct
 176 S S S Y G E Q N S D S H Q S S S G R G Q C G S G S G Q S P N Y G Q H G S
 pAB (rabbit) (Fleming et al., 2012)

707 ggctccggacagctcttccagcaatgacacacatgggtctgggtcaggccagctcttctggctttagtcaacacaaagttagctcagggcagttctctgttaccgt
 211 G S G Q S S S N D T H G S G S G Q S S G F S Q H K S S S G Q S S G Y S

812 cagcatggatctgggtcaggctcactcctctggctacggacaacacggctctaggtcaggacagtcattcagggtgaacagacacagatctagctcagggtcgtct
 246 Q H G S G S G H S S G Y G Q H G S R S G Q S S R G E R H R S S S G S S
 pAB (rabbit) (Henry et al., 2011)

917 tccagctatggctcagcatgggtctgtgtcccgctcagttcttggggccagggccgacaagggtctggatctcgcagctctcctagccagctccgacatgggtccggt
 281 S Y G Q H G S R Q S L G H G R Q G S G S P S H V R H G S G

1022 tcggggcactcctccagccacggccaacacgggtctggctcaagttactcttacagccgtggccattatgagttcggctcaggccagactcttggcttgggcaa
 316 S G H S S S H G Q H G S G S S Y S Y S R S G H Y E S G Q T S G F G Q

1127 catgagttcgggtcaggacagtcctctggctatagtaagcatgggtctgggtcaggctcactcctctagccagggaacaatgagatctacgtcaggccaggtatca
 351 H E S G S G Q S S G Y S K H G S G S G H S S S Q G Q H G S T S G Q A S

1232 agctctggccaacatgggtccagctcagctcagttctccagctatgggtcagcatgagttcgcctcccgctcactcttcaggccggcgccaacacagctctggatct
 386 S S G Q H G S S S R Q S S S Y G Q H E S A S R H S S G R G Q H S S G S

1337 ggccagttctccaggccacggccagctgggtctgggtcagggcagttctccagctcggccaacatgggactgggttgggtcagctctccagcagttggccatat
 421 G Q S P G H G Q R G S G S G Q S P S S G Q H G T G F G R S S S S G P Y

1442 gtgtctgggtcaggctactcttctgggttgggtcaccacagttctagctcagagcattcctctgggtacactcagcatggatctgggtcaggtcactcctccggc
 456 V S G S G Y S S G F G H H E S S S E H S S G Y T Q H G S G S G H S S G

1547 caccgacaacacggctctaggtcaggacagtcattcagggtgaacgacaaggatctagtcagggtcattcttccagctatgggtcagcatgggtctgggtccggt
 491 H G Q H G S R S G Q S S R G E R Q G S S A G S S S Y G Q H G S G S R
 pAB (rabbit) (Henry et al., 2011)

1652 caatcttgggacacagccgacatgggtctggatctggccagctccttagccctagccgtggccgacatgagttcgggtccaggcagttctccagctatggcca
 526 Q S L G H S R H G S G S G Q S P S P S R G R H E S G S Q S S S Y G P

1757 catgggtatgggtcaggggaggtcttcaagccgtggcccatatgagttcgggtcgggtcactccttctgggttaggtcaccaagagttcgtcaggacagttctct
 561 H G Y G S G R S S S R G P Y E S G S G H S S G L G H Q E S R S G Q S S

1862 ggctacggtaacacggatctagctcgggtcattcctctaccatgggcaacatgggtctacatcaggacagtcattcaggtctggccaacatggagctaccta
 596 G Y G Q H G S S S G H S S T H G Q H G S T S G Q S S S G G Q H G A T S

1967 ggtagttctccagccaggtcagcatgggtctgggtcaggctcctctcgtatggccaacagggctcggatctggcagttcctagtcggcgccagat
 631 G Q S S S H G Q H G S G S S Q S S R Y G Q H G S G S G Q S P S R G R H

2072 gggctccgatttgggcaactcttccagctacggccaacatgggtctgggtccgggtgggtcttcaagcaatggccacatgggtctgtctcaggccagttcttccggc
 666 G S D F G H S S S Y G Q H G S G S G W S S S N G P H G S V S G Q S S G

2177 ttgtgtcacaagttcgggtcagggcagttcctctgtgtacagtcagcatggatctgggtcagttcactcctccggctacagaaaaacacgggtctaggtcaggacag
 701 F G H K S G S G S G Y S Q H G S S S H S S G Y R K H G S G Q

2282 tcatctaggagtgaacaacacggatctagctcaggtttgtcttccagctatgggtcagcatgggtcgggtcccatcaatcttccggccacggccgacaagggtct
 736 S S R S E Q H G S S S G L S S S Y G Q H G S G S H Q S G H G R Q G S

2387 ggatctggcactctcctagccgtgtccgacatgggtccagttcagggcactcctccagccacggccaacacgggtctggcacaagttgttcttccagctgtggc
 771 G S G H S P S R V R H G S S S G H S S S H G Q H G S G T S C S S S C G

2492 cattatgagttcgggtcaggccaggtcttctgttttgggcaacacaggtctgggtcaggacagggctatagtcagcatgggtctgcctcagggtcacttctctagc
 806 H Y E S G S G Q A S G F G Q H E S G S G Q G Y S Q H G S A S G H F S S

2597 cagggaacacatggatctcagtcagggcagttcattcaggtccggccaacatgactctagctcaggtcaatcttccagctatgggtcagcatgagttcgtcctccat
 841 Q G R H G S T S G Q S S S G Q H D S S S G Q S S S Y G Q H E S A S H

2702 caccgtctgggcccggccgacatgggtctggatctggccagttctccagccacggccagcgtgggtctgggtcagggcagttctccagctatggccgacatggg
 876 H A S G R G R H G S G S G Q S P G H G Q R G S S S G Q S P S Y G R H G

2807 tctgggtccgggtcttccagcagttcggccagatgggtctgggtcaggccagttcttgggttgggtcacaagtttagctcagggcagttcctctgtttacact
 911 S G S G R S S S S G R H G S S S G Q S S G F G H K S S S G Q S S G Y T

2912 cagcatggatctgggtcaggtcactcctccagctacgaacaacacgggtctaggtcaggacagtcattcagggtgaacaacatggatctagctcaggttctgtct
 946 Q H G S G S G H S S S Y E Q H G S R S G Q S S R S E Q H G S S S G S S

pAB (rabbit) (Henry et al., 2011)

3017 tccagctatgggtcagcatgggtctggctcccgctcagctctttgggccaacgccaacatgggtctggatctggcagctctccagccctagccggtggccgacatggg
981 S S Y G Q H G S G S R Q S L G H G Q H G S G S G Q S P S P S R G R H G

3122 tctgggtccgggagctctccagctatggcccatataggtctggctcagggtgggtcttcaagccgtggcccatatgagtctggctccgggtcactctctggctta
1016 S G S G Q S S S Y G P Y R S G S G W S S S R G P Y E S G S G H S S G L
→ 1075-1172 (98aa) – 3299 - 3592 (294bp)

3227 ggtcaccgagagctctcgctcaggacagctctctggctacgggtcaacatggatctagctcaggtcattctctaccatgggccaacacggttctacatcaggacag
1051 G H R E S R S G Q S S G Y G Q H G S S S G H S S T H G Q H G S T S G Q
Anti-Hornerin2 pAB (goat)

3332 tcctcagctgtggccaacatggagctagctcaggtcagttctccagccacggctcagcatggctctggctcgaagtcagctctctggctatggccgacagggtctct
1086 S S S C G Q H G A S S G Q S S S H G Q H G S G S S Q S S S G Y G R Q G S

3437 ggtatctggccagctctccagccacggccacgctgggtctgggtcaaggcagctctccagctacggccgacatgggtctggctccgggtcgttctccagcaggtggc
1121 G S G Q S P G H G Q R G S G S R Q S P S Y G R H G S G S G R S S S S G

3542 caacatgggtctggcttaggcagctctctggctttgggtcaccacgagctctagctcagggcagctctctagttacagtcagcatgggtctggctcaggtcactcc
1156 Q H G S G L G E S S G F G H H E S S S G Q S S S Y S Q H G S G S G H S

3647 tctggctacgggacaacacggctctagatcaggacagctcattaggggtgaacgacacggatctagctcaggtctctctccactatggctcagcatgggtctggc
1191 S G Y G Q H G S R S G Q S S R G E R H G S S S G S S S H Y G Q H G S G

pAB (rabbit) (Henry et al., 2011)

3752 tcccgtcagctcttgggccaacggcgaaggtctggatctggcattccctagccggcgacatgggtccgggttggggcactctccagccacggccaa
1226 S R Q S S G H G R Q G S G S G H S P S R G R H G S G L G H S S S H G Q

3857 catgggtctggctcaggtctgttctccagccgtggcccatatagctctcgtctgggtcactctctctgtcttgggtcaacatgagctctggctcaggacattctct
1261 H G S G S G R S S S R G P Y E S R S G H S S V F G Q H E S G S G H S S

3962 gcttacagtcagcatggtagtggtcagggcactctctgtagccaaggacagcatggttctacatcaggacagtcacacaccttgaccaggaggatctagcaca
1296 A Y S Q H G S G S G H F C S Q G Q H G S T S G Q S S T F D Q E G S S T

4067 ggccagctctccagctatggccacgctggctctggctccagtcagctctctggctatggccgacatgggtctggatctggccagctctctagtcggccgacat
1331 G Q S S S Y G H R G S G S S Q S S G Y G R H G A G S G Q S P S R G R H

4172 gggctccggttctgggcaactctccagctacggccaacatgggtctggctccggttgggtctccagtcagtgccgacatgggtctggctcaggtcagctctctgga
1366 G S G S G H S S S Y G Q H G S G S G W S S S S G R H G S G S G Q S S G

4277 tttggctaccacagctctagctcatggcagctctctgggtgcaactcagcatggtatctggctcaggtcactctccagctacgaacaacacgggtctaggtcagga
1401 F G H H E S S S W Q S S G C T Q H G S G S G H S S S Y E Q H G S R S G
pAB (rabbit)

4382 cagtcacttaggggtgaacgacacggatctagctcaggttctctccagctatggctcagcatgggtctggctcccgctcagctcttgggccaacgccaacatggg
1436 Q S S R G E R H G S S S G S S S S Y G Q H G S G S R Q S L G H G Q H G
(Henry et al., 2011)

4487 tctggatctggccagctctccagccctagccgtggccgacatgggtctgggtctgggtcagctctccagctacagcccatatgggtctgggtcaggttgggtctcc
1471 S G S G Q S P S P S R G R H G S G S G Q S S S Y S P Y G S G S G W S S

4592 agccgtggcccatatgagctctggctcagtcactctctggcttaggtcaccgagagctctcgtcaggtcagctctctggctcaggtcacaacatggatctagctca
1506 S R G P Y E S G S S H S S G L G H R E S R S G Q S S G Y G Q H G S S S

pAB (rabbit) (Makino et al., 2014; Takaishi et al., 2005)

4697 ggtcattctctaccatgggccaacatgggtctacatcaggacagtcacgagctgtggccaacatggagctagctcaggtcagctctccagccacgggtcagcat
1541 G H S S T H G Q H G S T S G Q S S S C G Q H G A S S G Q S S S H G Q H

4802 ggctctgggtcgaagtcagttcttggctatggccgacagggtctggatctggccagctctccagccacggccagctgggtctgggtcgaaggcagttctccagc
1576 G S G S S Q S S G Y G R Q G S G S G Q S P G H G Q R G S G S R Q S P S

4907 tacggccgacatgggtctggctccggtcgttctccagcagtgcccaacatgggtctgggttaggcagctctctggcttgggtcaccacgagctctagctcaggg
1611 Y G R H G S G S G R S S S S G Q H G S G L G E S S S G F G H H E S S S G

5012 cagtcctctagttacagtcagcatgggtctggctcaggtcactctctggctacggacaacacgggtctagatcaggacagtcattaggggtgaacgacacgga
1646 Q S S S Y S Q H G S G S G H S S G Y G Q H G S R S G Q S S R G E R H G
pAB (rabbit) (Henry et al., 2011)

5117 tctagctcaggttctgttctcccgctatggctcagcatgggtctggctcccgctcagctctctgggccaacgccaacggtctggatctggcagctccctagccgc
1681 S S S R S S S R Y G Q H G S G S R Q S S G H G R Q G S G S G Q S P S R

5222 ggccgacatgggtccggttgggcaactctccagccacggccaacatgggtctgggtcaggtcgttctccagccgtggcccatatgagtctcgtcgggtcag
1716 G R H G S G L G H S S S H G Q H G S G S G R S S S R G P Y E S R S G H

5327 tcttctgtcttgggtcaacatgagttctggctcaggacattctctgcttacagtcagcatggtagtggtcagggcactctctgtagccaaggacagcatggttct
1751 S S V F G Q H E S G S G H S S A Y S Q H G S G S G H F C S Q G Q H G S

5432 acatcaggacagtcacacaccttgaccaggagggtatctagcacaggtcagttctccagccacgggtcagcatggctctggctcagtcagttcttagctatggc
1786 T S G Q S S T F D Q E G S S T G Q S S S H G Q H G S G S S Q S S S Y G

5537 caacagggtctctggatctggccagctctcttagtcggccgacatgggtccgggtccgggcactctccagctacggccaacatgggtctgggtccgggttgggtct
1821 Q Q G S G S G Q S P S R G R H G S G S G H S S S Y G Q H G S G S G W S

5642 tccagcagtgccgacatgggtctgggtcaggtcagttcttggatttgggtcaccatgagttctagctcagtcagtcctctgggttacactcagcatggatctggc
1856 S S S G R H G S G S G Q S S G F G H H E S S S W Q S S G Y T Q H G S G

5747 tcaggtcactctccagctacgaacaacacgggtctaggtcaggacagtcattaggggtgaacaacacggatctagctcaggttctctccagctatgggtcag
1891 S G H S S S Y E Q H G S R S G Q S S R G E Q H G S S S G S S S Y G Q
pAB (rabbit) (Henry et al., 2011)

5852 catgggtctgggtcccgctcagttcttgggccaacgccaacatgggtctggatctggccagctctctagccctagccgtggccgacatgggtctgggtctgggcag
1926 H G S G S R Q S L G H G Q H G S G S G Q S P S P S R G R H G S G S G Q

5957 tcttccagctacggcccatatgggtctgggtcaggttgggtctccagccgtggcccatatgagttctgggtccggtcactctctgggttaggtcaccgagagttct
1961 S S S Y G P Y G S G S G W S S S R G P Y E S G S G H S S G L G H R E S

6062 cgctcaggacagctctctggctacgggtcaacatgtagctcaggtcattcctctaccatgggcaacatgggtctgcatcaggacagctcatcagctgtggc
1996 R S G Q S S G Y G Q H G S S S G H S S T H G Q H G S A S G Q S S S **G** G

6167 caacatggagctagctcaggtcagttctccagccacgggtcagcatggctctggctcaagtcagttctctggctatggccagacagggtcttgatctggccagctc
2031 Q H G A S S G Q S S S H G Q H G S G S S Q S S G Y G R Q G S G S G Q S

6272 ccaggccacggccagcgtgggtctgggtcaaggcagctctccagctatggccagacatgggtctggctccggctcgttctccagcagtgcccaacatgggcctggc
2066 P G H G Q R G S G S R Q S P S Y G R H G S G S G R S S S S G Q H G P G

6377 ttagcgagctctctggctttgggtcaccacagctcagctcaggtcagctccttagttacagtcagcatgggtctggctcaggtcactcctctggctacggacaa
2101 L G **E** S S G F G H H **E** S S S G Q S S S Y S Q H G S G S G H S S G Y G **Q**

6482 caccgctctagatcaggacagctcatctaggggtgaacgacacggatctagctcaggtctcgtcttcccgctatggctcagcatgggtctggctcccgctcagttctcg
2136 **H G S R S G Q S S R** G **E** R H G S S S G S S S R Y G Q H G S G S R Q S S
pAB (rabbit) (Henry et al., 2011)

6587 ggccacggccgacaaagggtctggatctggccattcccttagccggccgacatgggtccgggtccgggcaactcctccagccacggcccaacatgggtctggctca
2171 G H G R Q G S G S G H S P S R G R H G S G S G H S S S H G Q H G S G S

6692 ggtcgttctccagccgtggcccatatgagctcgtcgggtcactctctgtctttgggtcaacatgagctcgtcggctcaggacattcctctgcttacagtcagcat
2206 G R S S S R G P Y **E** S R S G H S S V F G Q H **E** S G S G H S S A Y S Q H

6797 ggtagtggtcagggcactctctgtagccaaggacagcatggttctacatcaggacagtcacacatttgaccaggaggatctagcacaggctcagttctccagc
2241 G S G S G H F **C** S Q G Q H G S T S G Q S S T F D Q **E** G S S T G Q S S S

6902 caccggtcagcatgggtctgggtcgaagtcagttcttagctatggcccaacagggtctggatctggccagttctcctagtcggccgacatgggtccgggtccggg
2276 H G Q H G S G S S Q S S S Y G Q Q G S G S G Q S P S R G R H G S G S G

7007 cactctccagctacggcccaacatgggtctgggtccgggttggctctccagcagtgccgacatgggtctggctcaggtcagttcttgatttggtcaccacag
2311 H S S S Y G Q H G S G S G W S S S S G R H G S G S G Q S S G F G H H **E**

7112 tctagctcatggcagctcctctggttacactcagcatggtatctgggtcaggtcactcctccagctacgaacaacacggctctaggtcaggacagctcatctaggggt
2346 S S S W Q S S G Y T Q H G S G S G H S S S Y **E** **Q H G S R S G Q S S R** G
pAB (rabbit) (Henry et al., 2011)

7217 gaacgacacggatctagctcaggttcatcttccagctatgggtcagcatgggtctggctcccgctcagttcttgggcccagcccaacatgggtctggatctggccag
2381 **E** R H G S S S G S S S S Y G Q H G S G S R Q S L G H G Q H G S G S G Q

7322 tctcctagccctagccgtggccgacatgggtctgggtcttgggtcagttctccagctacagcccatatgggtctgggtcaggttggtcttccagccgtggcccatat
2416 S P S P S R G R H G S G S G Q S S S Y S P Y G S G S G W S S S R G P Y

7427 gagtctgggtccgggtcactctctggttaggtcaccgagagctctcgtcaggtcaggtcactctgggtcaggtcaacatggatctagctcaggtcattctctacc
2451 **E** S G S G H S S G L G H R **E** S R S G Q S S G Y G Q H G S S S G H S S T

7532 catgggcaacatggttctacatcaggacagtcacagctgtggccaacatggagctagctcaggtcagttctccagccacgggtcagcatgggtctgggtcgaag
2486 H G Q H G S T S G Q S S S **C** G Q H G A S S G Q S S S H G Q H G S G S S

7637 cagttcttgggtatggccgacagggtctggtatctggccagttctccagccacgggtcaggtctgggtctgggtcgaaggcagttctccagctacggccgacatggg
2521 Q S S G Y G R Q G S G S G Q S P G H G Q R G S G S R Q S P S Y G R H G
→ 2576-2707 (132aa) – 7802 - 8198 (396bp)

7742 tctgggtccgggtcgttctccagcagtgcccaacatgggtctgggttagggcagttcttgggttgggtcaccacaggtctagctcagggcagttctctagttac
2556 S S G R S S S G Q H G S G L G **E** S S **G F G H H E** S S S G Q S S S Y
→ 2591-2684 (94aa) – 7847 - 8128 (282bp)

7847 agtcagcatgggtctgggtcaggtcactcctctggtctacggacaaacacgggtctagatcaggacagtcactctaggggtgaacgacacggatctagctcaggttctg
2591 **S Q H G S G S G H S S S G Y G** **Q H G S R S G Q S S R** **G E R H G S S S G S**
Anti-Hornerin3 pAB (goat)

pAB (rabbit) (Henry et al., 2011)

7952 tcttccactatgggtcagcatgggtctgggtcccgctcagttcttgggcccagccgacaaagggtctggatctggccagtcctcctagccggccgacatgggtcc
2626 S S H Y G Q H G S G S R Q S S S G H G R Q G S G S G Q S P S R G R H G S

8057 gggttggggtcactcctccagccacggcccaacatgggtctgggtcaggtcgttcttccagccgtggcccatatgagttctcgttgggtcactctctgttcttgggt
2661 **G I** G H S S S H G Q H G S G S G R S S S R G P Y **E** S R L G H S S V F G
→ 2727-2850 (124aa) – 8255 - 8629 (375bp)

8162 caacatgagttctgggtcaggacattcctctgcttacagtcagcatggttagtggtcagggcactctctgtagcaaggacagcatggttctacatcaggacagtc
2696 **Q H E** S G S G H S S A Y S Q H G S G S G H F **C** S Q G Q H G S T **S G Q S**
Anti-Horner
aa) – 8255 - 8629 (375bp)

8267 tcaacctttgaccaggagggatctagcagacggcagttctccagctatggccacgggtcgtctgggtccagtcagttcttgggtatggccgacatgggtctgga
2731 **S T F D Q E** G S S T G Q S S S Y G H R G S G S S Q S S S G Y G R H G A G
in4 pAB (goat)

8372 tctggccagttctttagccacggccgacacgggtctgggtcagggcagttcttccagctacggcccaacatgggtctgggtcaggtcagttcttgggttatagtcag
2766 **S G Q S L S H G R H G S G S G Q S S S Y G Q H G S G S G Q S S S G Y S Q**

8477 catggaagtgggtcagggcaagatgggtattcttattgcaaggaggaagtaacctatgagggggaagtctgggtcatttttctcagttttctagtagcact
2801 **H G S G S G Q D G Y S Y** **C K G G S N H D G G** **S S G S Y F L S F P S S T**
pAB (rabbit) (Fleming et al., 2012)

8582 tcaacctatgaatatgtccaagagcagaggtgctacttttatcagtgga (8629)
2836 **S P Y E Y V Q E Q R C Y F Y Q** * (2850)
pAB (rabbit) (Fleming et al., 2012)

8630 ataataacataaatgcaatttactcaagtagcaatttaagaaataggaaagtcattctgaattcatcatgaaagacaagcaatccatcatgaaattctgttcta
8735 aaagtgaatcaatgcaattctgtctcttctttagagcctaaaactgtagcatatatcttgggttcttccaaagactgttaggcaatttggctacttt
8840 gtagaaaaactagtgaggaataacttggtagaatgaggtttaaactttaggaataatgaaagcttttaagagctttgggtttagtgagttgtcttttg
8945 agagctcatcattctttagatggtgccaagctaaccttctttagaagcaaaatattacaatgattacacagtcctagatatacaagctttgttttta
9050 cagcaattagtgtagcctaatttttagtggtgccccaggttgggtgtgccccatttttgggtattgtggcagaaggtgaaggtcttgaaagcaaatgtagcagc
9155 ggtagtgcttcttacttatcaaaacatcaagtccttttcttgggtatattttaaactagtaagtttaattagtgccataaaaagtagcatcaggtcttcttccc
9260 aagcagtgagcaagagcatttttcaataaagaatgaggtatttcatcttcaggaaaaaaacattcaaatgtgggttttagctgttttccagcagaagaat
9365 ctgtcctcatttttaagaggtgctcaatttgggaaatatattgaggagttattccatggaatacaatgcttccacctactactgttagttcaataaagtt
9470 tccacctgaaaaaatacatccatgcccagatgaaaggaagagtagtctgtcactgtacatagtttcttaatttgactgtaacacattgtttcaagttcttgg

9575 attcaacaaccgattgtattaaaattgacaataataaatgttgatt 9623

Abb. 52: HRNR-Nukleotid und Proteinsequenz mit rekombinanten Proteinen und Antikörpern.

Der kodierende Bereich der cDNA ist durch die unterhalb der Sequenz dargestellte Proteinsequenz vom nicht-kodierenden Bereich der cDNA abgegrenzt. Das Startcodon atg ist in grün, das Stopcodon tga ist in rot gekennzeichnet. In der ersten Spalte sind sowohl die Nummerierung der cDNA (rechtsbündig) als auch der Aminosäuresequenz (linksbündig und grau unterlegt) dargestellt. In der Sequenz sind die 76 Glutaminsäuren (rotes E), die 19 Lysine (blaues K) und die 16 Cysteine (gelb unterlegtes C) hervorgehoben. Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine sind durch einen Strich unterhalb der Proteinsequenz und einen Pfeil am Beginn und an Ende oberhalb der Nukleotidsequenz gekennzeichnet. Die Bezeichnung der ersten und letzten Aminosäure sowie in Klammern die Anzahl der Aminosäuren und des ersten und letzten Nukleotids sowie in Klammern die Anzahl der Nukleotide ist nach dem initialen Pfeil genannt. Türkis unterlegt sind die 4 Aminosäuresequenzen die in dieser Arbeit für die Generierung der polyklonalen Antikörper verwendet wurden. Unterhalb der Sequenzen sind die Bezeichnungen der jeweiligen Antikörper aufgeführt. Blau umrandet sind die 4 Aminosäuresequenzen die für die Generierung der polyklonalen Anti-Peptid Antikörper in der Beschreibung von Hornerin in Zellen des Brustgewebes und bei Brustkrebs verwendet wurden (Fleming et al., 2012). Grün unterlegt sind die Aminosäuresequenzen der beiden kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörper (Abnova PAB7432 pAB (goat) und Abnova PAB22558 pAB (rabbit)). Rot umrandet ist die Aminosäuresequenz die 10-mal in der Hornerinsequenz vorkommt und gegen die ein polyklonaler Anti-Peptid Antikörper generiert wurde der für die Lokalisation des Hornerins im epidermalen „cornified envelope“ verwendet wurde (Henry et al., 2011). Grün umrandet ist die Aminosäuresequenz gegen die ein polyklonaler Anti-Peptid Antikörper generiert wurde, der in zwei Veröffentlichungen genutzt wurde (Makino et al., 2014; Takaishi et al., 2005).

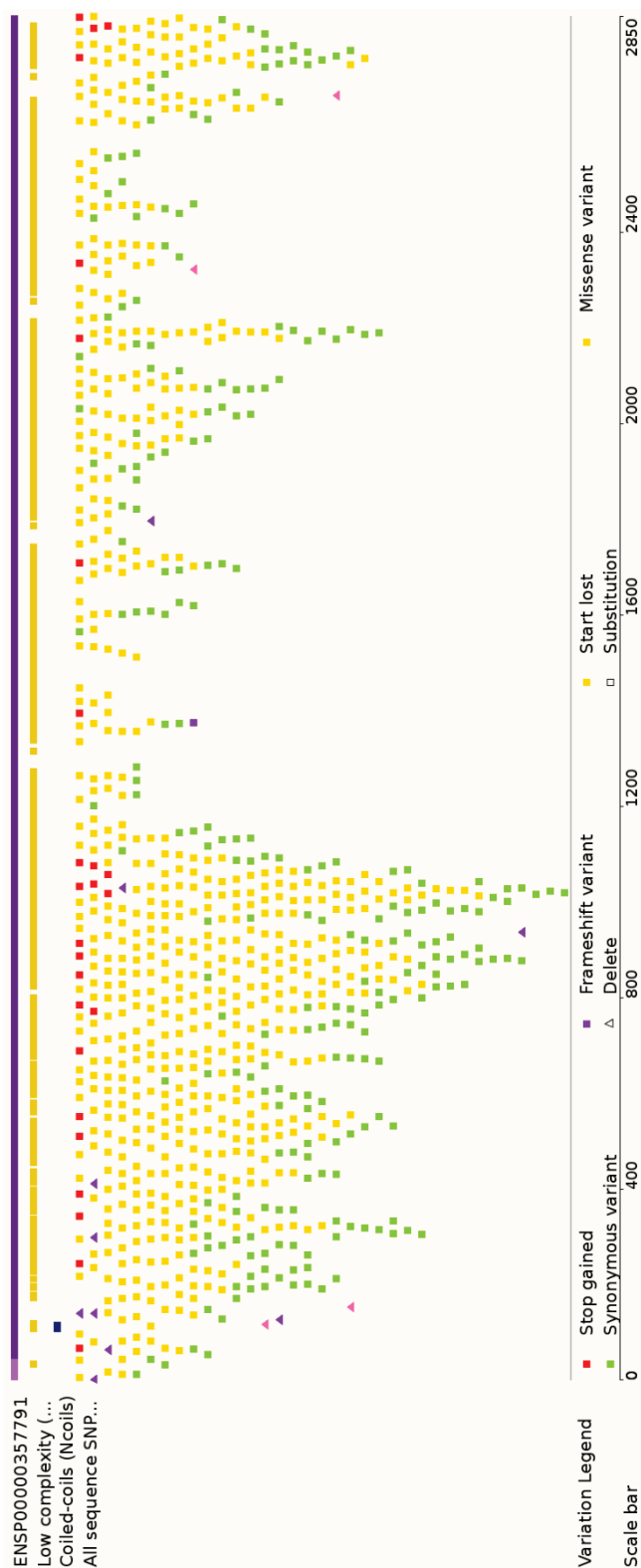
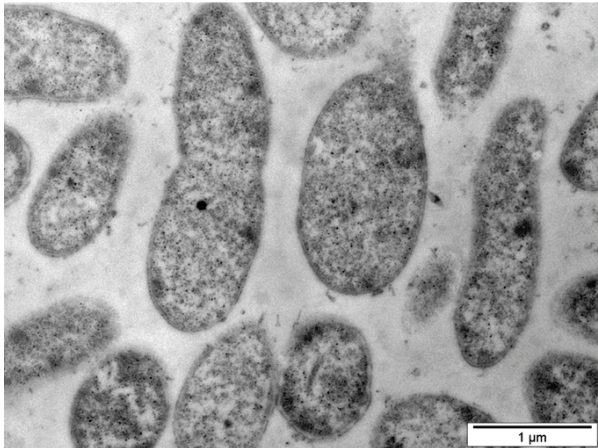


Abb. 53: Schematische Darstellung aller SNPs im HRNR.

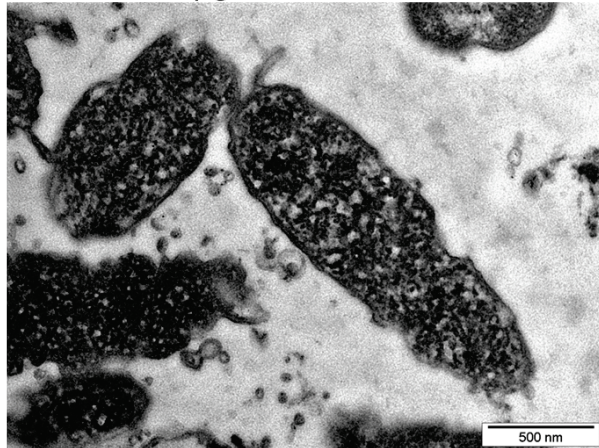
Darstellung aller 1618 SNPs im Hornerin zum Zeitpunkt der Abfrage unter <http://www.ensembl.org>. Gekennzeichnet sind mit roten Quadraten alle SNPs die zu einem zusätzlichen STOP-Codon führen, mit violetten Quadrat oder Dreiecken die SNPs, die zu einer Leserasterverschiebung führen, mit gelben Quadraten alle SNPs die zu einem Aminosäureaustausch führen und mit grünen Quadraten alle SNPs die zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz führen.

P. aeruginosa ATCC 10145 in 10 mM NaP pH 5,5 0,25% Glukose

Kontrolle



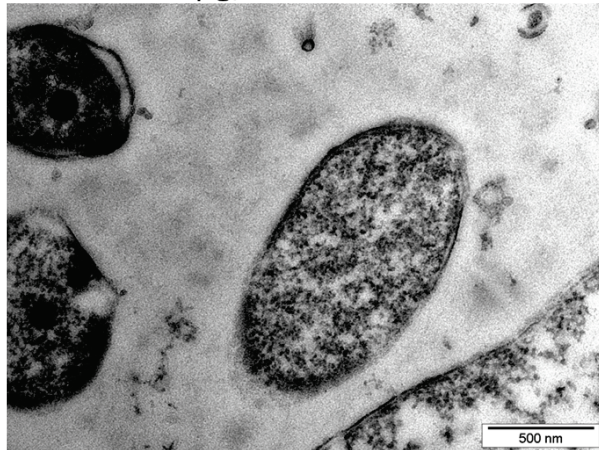
30 µg/ml Gentamicin



50 µg/ml Erythromycin



100 µg/ml Fusidinsäure



P. aeruginosa ATCC 10145 in 10 mM NaP pH 7,3 1% TSB

Kontrolle



90 µg/ml Chlorhexidin



Abb. 54: Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) von *P. aeruginosa* ATCC 10145 nach Inkubation mit verschiedenen Antibiotika. Die Inkubation erfolgte mit der angegebenen Konzentration der Antibiotika in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,5 mit 0,25 % Glukose (13,88 mM) oder 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,3 mit 1 % TSB über 120 min bei 37°C. Die Bakterien wurden wie in den Antimikrobiellen Tests vorab in Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium kultiviert.

10 Literaturverzeichnis

- Agache, P. (2004a). The Human Skin: An Overview. In *Measuring the skin*, P.H. Pierre Agache, ed. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 3-5.
- Agache, P. (2004b). Main Skin Physical Constants. In *Measuring the skin*, P.H. Pierre Agache, ed. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 747-757.
- Agache, P. (2004c). Presentation of the Skin Surface Ecosystem. In *Measuring the skin*, P.H. Pierre Agache, ed. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 21-32.
- Akiyama, M., Matsuo, I., and Shimizu, H. (2002). Formation of cornified cell envelope in human hair follicle development. *The British journal of dermatology* *146*, 968-976.
- Alibardi, L. (2004). Fine structure and immunocytochemistry of monotreme hairs, with emphasis on the inner root sheath and trichohyalin-based cornification during hair evolution. *Journal of morphology* *261*, 345-363.
- Anderson, B.L., Berry, R.W., and Telser, A. (1983). A sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gel electrophoresis system that separates peptides and proteins in the molecular weight range of 2500 to 90,000. *Anal Biochem* *132*, 365-375.
- Andersson, E., Rydengard, V., Sonesson, A., Morgelin, M., Bjorck, L., and Schmidtchen, A. (2004). Antimicrobial activities of heparin-binding peptides. *European journal of biochemistry / FEBS* *271*, 1219-1226.
- Archer, C.B. (2010a). Functions of the Skin. In *Rooks Textbook of Dermatology*, S.B. Tony Burns, Neil Cox, Christopher Griffiths, ed. (John Wiley & Sons Ltd), pp. 4.1-4.11.
- Archer, C.B. (2010b). Functions of the Skin - Immunological functions. In *Rooks Textbook of Dermatology*, S.B. Tony Burns, Neil Cox, Christopher Griffiths, ed. (John Wiley & Sons Ltd), pp. 4.8-4.9.
- Aubin, G.G., Portillo, M.E., Trampuz, A., and Corvec, S. (2014). *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Medecine et maladies infectieuses*.
- Bahar, A.A., and Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* *6*, 1543-1575.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* *305*, 1622-1625.
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1998). Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *The Journal of clinical investigation* *102*, 874-880.
- Barlow, P.G., Li, Y., Wilkinson, T.S., Bowdish, D.M., Lau, Y.E., Cosseau, C., Haslett, C., Simpson, A.J., Hancock, R.E., and Davidson, D.J. (2006). The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *Journal of leukocyte biology* *80*, 509-520.

- Bastian, A., and Schafer, H. (2001). Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul Pept* 101, 157-161.
- Bennike, T., Lauridsen, K.B., Kruse Olesen, M., Andersen, V., Birkelund, S., and Stensballe, A. (2013). Optimizing the Identification of Citrullinated Peptides by Mass Spectrometry: Utilizing the Inability of Trypsin to Cleave after Citrullinated Amino Acids. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* 6, 8.
- Biegert, A., and Soding, J. (2008). De novo identification of highly diverged protein repeats by probabilistic consistency. *Bioinformatics* 24, 807-814.
- Bikle, D.D., Oda, Y., and Xie, Z. (2004). Calcium and 1,25(OH)₂D: interacting drivers of epidermal differentiation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 89-90, 355-360.
- Bikle, D.D., Xie, Z., and Tu, C.L. (2012). Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab* 7, 461-472.
- Blume-Peytavi, U., and Vogt, A. (2011). Human hair follicle: reservoir function and selective targeting. *The British journal of dermatology* 165 Suppl 2, 13-17.
- Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual review of immunology* 13, 61-92.
- Boman, H.G. (2000). Innate immunity and the normal microflora. *Immunological reviews* 173, 5-16.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bratt, C.L., Wertz, P., Drake, D., Dawson, D.V., and Brogden, K.A. (2011). Antimicrobial Lipids of the Skin and Tear Film. In *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*, H. Thormar, ed. (Chichester: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 99-122.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews Microbiology* 3, 238-250.
- Brown, S.A., Palmer, K.L., and Whiteley, M. (2008). Revisiting the host as a growth medium. *Nature reviews Microbiology* 6, 657-666.
- Burgess-Brown, N.A., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U., and Gileadi, O. (2008). Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein expression and purification* 59, 94-102.
- Byrne, C., Tainsky, M., and Fuchs, E. (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 120, 2369-2383.
- Cabral, A., Voskamp, P., Cleton-Jansen, A.M., South, A., Nizetic, D., and Backendorf, C. (2001). Structural organization and regulation of the small proline-rich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function. *The Journal of biological chemistry* 276, 19231-19237.

- Campen, A., Williams, R.M., Brown, C.J., Meng, J., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2008). TOP-IDP-scale: a new amino acid scale measuring propensity for intrinsic disorder. *Protein and peptide letters* 15, 956-963.
- Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 328-340.
- Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A., and Frasconi, P. (2006). DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic acids research* 34, W177-181.
- Chamorro, C.I., Weber, G., Gronberg, A., Pivarcsi, A., and Stahle, M. (2009). The human antimicrobial peptide LL-37 suppresses apoptosis in keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 129, 937-944.
- Chapman, S.J., and Walsh, A. (1990). Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Archives of dermatological research* 282, 304-310.
- Chavanas, S., Mechin, M.C., Nachat, R., Adoue, V., Coudane, F., Serre, G., and Simon, M. (2006). Peptidylarginine deiminases and deimination in biology and pathology: relevance to skin homeostasis. *Journal of dermatological science* 44, 63-72.
- Chemes, L.B., Alonso, L.G., Noval, M.G., and de Prat-Gay, G. (2012). Circular dichroism techniques for the analysis of intrinsically disordered proteins and domains. *Methods in molecular biology* 895, 387-404.
- Chertov, O., Michiel, D.F., Xu, L., Wang, J.M., Tani, K., Murphy, W.J., Longo, D.L., Taub, D.D., and Oppenheim, J.J. (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 271, 2935-2940.
- Chevallet, M., Luche, S., and Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols* 1, 1852-1858.
- Christophers, E., and Kligman, A.M. (1964). Visualization of the Cell Layers of the Stratum Corneum. *The Journal of investigative dermatology* 42, 407-409.
- Chronnell, C.M., Ghali, L.R., Ali, R.S., Quinn, A.G., Holland, D.B., Bull, J.J., Cunliffe, W.J., McKay, I.A., Philpott, M.P., and Muller-Rover, S. (2001). Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in acne vulgaris lesions. *The Journal of investigative dermatology* 117, 1120-1125.
- Chuong, C.M. (1998). Morphogenesis of Epithelial Appendages: Variations on Top of a Common Theme and Implications in Regeneration. In *Molecular Basis of Epithelial Appendage Morphogenesis*, C. Chuong, ed. (Landes Bioscience), p. 444.
- Cole, H.L., Kalapothakis, J.M., Bennett, G., Barran, P.E., and Macphee, C.E. (2010). Characterizing early aggregates formed by an amyloidogenic peptide by mass spectrometry. *Angewandte Chemie* 49, 9448-9451.

- Contzler, R., Favre, B., Huber, M., and Hohl, D. (2005). Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation. *The Journal of investigative dermatology* *124*, 990-997.
- Cooper, M.D., and Alder, M.N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell* *124*, 815-822.
- Cortese, M.S., Baird, J.P., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2005). Uncovering the unfoldome: enriching cell extracts for unstructured proteins by acid treatment. *Journal of proteome research* *4*, 1610-1618.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* *284*, 1318-1322.
- Cotsarelis, G., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* *61*, 1329-1337.
- Coulson, I.H. (2010). Disorders of Sweat Glands. In *Rooks Textbook of Dermatology*, S.B. Tony Burns, Neil Cox, Christopher Griffiths, ed. (John Wiley & Sons Ltd), pp. 44.41-44.22.
- Dale, B.A., and Ling, S.Y. (1979). Evidence of a precursor form of stratum corneum basic protein in rat epidermis. *Biochemistry* *18*, 3539-3546.
- Dale, B.A., Presland, R.B., Lewis, S.P., Underwood, R.A., and Fleckman, P. (1997). Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *The Journal of investigative dermatology* *108*, 179-187.
- Davis, B.J. (1964). Disc Electrophoresis. li. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann N Y Acad Sci* *121*, 404-427.
- de Berker, D.A.R., and Baran, R. (2010). Disorders of nails. In *Rooks Textbook of Dermatology*, S.B. Tony Burns, Neil Cox, Christopher Griffiths, ed. (John Wiley & Sons Ltd), pp. 65.61-65.57.
- De Lucca, A.J., and Walsh, T.J. (1999). Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* *43*, 1-11.
- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *The Journal of cell biology* *180*, 451-458.
- Deng, X., Eickholt, J., and Cheng, J. (2009). PreDisorder: ab initio sequence-based prediction of protein disordered regions. *BMC bioinformatics* *10*, 436.
- Deng, X., Eickholt, J., and Cheng, J. (2012). A comprehensive overview of computational protein disorder prediction methods. *Mol Biosyst* *8*, 114-121.
- Drake, D.R., Brogden, K.A., Dawson, D.V., and Wertz, P.W. (2008). Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *Journal of lipid research* *49*, 4-11.

- Dwyer, D.J., Belenky, P.A., Yang, J.H., MacDonald, I.C., Martell, J.D., Takahashi, N., Chan, C.T., Lobritz, M.A., Braff, D., Schwarz, E.G., *et al.* (2014). Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E2100-2109.
- Dwyer, D.J., Camacho, D.M., Kohanski, M.A., Callura, J.M., and Collins, J.J. (2012). Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Molecular cell* 46, 561-572.
- Eagle, H., and Musselman, A.D. (1948). The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *The Journal of experimental medicine* 88, 99-131.
- Ebling, F.J.G. (1992). Functions of the Skin. In *Textbook of Dermatology*, W.D. Rook A, Ebling FJG, Champion RH, Burton JL, ed. (Oxford: Blackwell Scientific Publications), pp. 125-155.
- Eckert, R.L., Broome, A.M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D., and Lee, K. (2004). S100 proteins in the epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 123, 23-33.
- Eckert, R.L., Crish, J.F., and Robinson, N.A. (1997). The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiological reviews* 77, 397-424.
- Eckert, R.L., Sturniolo, M.T., Broome, A.M., Ruse, M., and Rorke, E.A. (2005a). Transglutaminase function in epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 124, 481-492.
- Eckert, R.L., Sturniolo, M.T., Broome, A.M., Ruse, M., and Rorke, E.A. (2005b). Transglutaminases in epidermis. *Progress in experimental tumor research* 38, 115-124.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 3471-3480.
- Egelrud, T. (2000). Desquamation in the stratum corneum. *Acta dermato-venereologica Supplementum* 208, 44-45.
- Egidi, M.G., Rinalducci, S., Marrocco, C., Vaglio, S., and Zolla, L. (2011). Proteomic analysis of plasma derived from platelet buffy coats during storage at room temperature. An application of ProteoMiner technology. *Platelets* 22, 252-269.
- Ellinghaus, D., Baurecht, H., Esparza-Gordillo, J., Rodriguez, E., Matanovic, A., Marenholz, I., Hubner, N., Schaarschmidt, H., Novak, N., Michel, S., *et al.* (2013). High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nature genetics* 45, 808-812.
- Etoh, Y., Simon, M., and Green, H. (1986). Involucrin acts as a transglutaminase substrate at multiple sites. *Biochemical and biophysical research communications* 136, 51-56.
- Facchiano, A., and Facchiano, F. (2009). Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. *Amino acids* 36, 599-614.

Fazekas de St Groth, S., Webster, R.G., and Datyner, A. (1963). Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et biophysica acta* 71, 377-391.

Fernandez-Patron, C. (2002). Zinc-Reverse Staining Technique. In *The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker, ed. (Totowa: Humana Press Inc), pp. 251-257.

Fernandez-Vidal, M., Jayasinghe, S., Ladokhin, A.S., and White, S.H. (2007). Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. *Journal of molecular biology* 370, 459-470.

Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., *et al.* (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 38, D211-222.

Fleming, J.M., Ginsburg, E., Oliver, S.D., Goldsmith, P., and Vonderhaar, B.K. (2012). Hornerin, an S100 family protein, is functional in breast cells and aberrantly expressed in breast cancer. *BMC cancer* 12, 266.

Fleming, J.M., Miller, T.C., Quinones, M., Xiao, Z., Xu, X., Meyer, M.J., Ginsburg, E., Veenstra, T.D., and Vonderhaar, B.K. (2010). The normal breast microenvironment of premenopausal women differentially influences the behavior of breast cancer cells in vitro and in vivo. *BMC medicine* 8, 27.

Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Brent, S., Chen, Y., Clapham, P., Coates, G., Fairley, S., Fitzgerald, S., *et al.* (2011). Ensembl 2011. *Nucleic Acids Res* 39, D800-806.

Fluhr, J.W., Kao, J., Jain, M., Ahn, S.K., Feingold, K.R., and Elias, P.M. (2001). Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *The Journal of investigative dermatology* 117, 44-51.

Folk, G.E., Jr., and Semken, H.A., Jr. (1991). The evolution of sweat glands. *International journal of biometeorology* 35, 180-186.

Fontana, A., Spolaore, B., Mero, A., and Veronese, F.M. (2008). Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. *Advanced drug delivery reviews* 60, 13-28.

Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature reviews Microbiology* 3, 948-958.

Francolini, I., and Donelli, G. (2010). Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59, 227-238.

Fuchs, E., and Byrne, C. (1994). The epidermis: rising to the surface. *Current opinion in genetics & development* 4, 725-736.

Fuchs, E., and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033-1042.

- Fuchs, E., and Horsley, V. (2008). More than one way to skin. *Genes & development* 22, 976-985.
- Gallo, R.L., and Nizet, V. (2008). Innate barriers against infection and associated disorders. *Drug discovery today Disease mechanisms* 5, 145-152.
- Galzitskaya, O.V., Garbuzynskiy, S.O., and Lobanov, M.Y. (2006). FoldUnfold: web server for the prediction of disordered regions in protein chain. *Bioinformatics* 22, 2948-2949.
- Gan, S.Q., McBride, O.W., Idler, W.W., Markova, N., and Steinert, P.M. (1990). Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* 29, 9432-9440.
- Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1994). Defensins. *Current opinion in immunology* 6, 584-589.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocol Handbook*, J.M. Walker, ed. (Humana Press), pp. 571-607.
- Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J.M. (2005). Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nature immunology* 6, 57-64.
- Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1997). Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88, 553-560.
- Gough, J., Karplus, K., Hughey, R., and Chothia, C. (2001). Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J Mol Biol* 313, 903-919.
- Greenhalgh, D.G. (2009). Topical antimicrobial agents for burn wounds. *Clinics in plastic surgery* 36, 597-606.
- Grice, E.A., and Segre, J.A. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews Microbiology* 9, 244-253.
- Gruber, M., Soding, J., and Lupas, A.N. (2005). REPPER--repeats and their periodicities in fibrous proteins. *Nucleic Acids Res* 33, W239-243.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews Microbiology* 2, 95-108.
- Hamilton, E.H., Payne, R.E., Jr., and O'Keefe, E.J. (1991). Trichohyalin: presence in the granular layer and stratum corneum of normal human epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 96, 666-672.

- Hansmann, B. (2009). Proteinexpressionsanalysen und Funktionsuntersuchungen von Ifaporsiasin in der menschlichen Haut In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät (Kiel: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel), pp. 142.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J.M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *The Journal of biological chemistry* 276, 5707-5713.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J.M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861.
- Harder, J., Gläser, R., and Schröder, J.M. (2007). The role and potential therapeutical applications of antimicrobial proteins in infectious and inflammatory diseases. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 7, 75-82.
- Harder, J., and Schröder, J.M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *The Journal of biological chemistry* 277, 46779-46784.
- Harder, J., and Schröder, J.M. (2005). Antimicrobial peptides in human skin. *Chemical immunology and allergy* 86, 22-41.
- Harding, C.R. (2004). The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatologic therapy* 17 Suppl 1, 6-15.
- Harding, C.R., and Scott, I.R. (1983). Histidine-rich proteins (filaggrins): structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. *Journal of molecular biology* 170, 651-673.
- Hardy, M.H. (1992). The secret life of the hair follicle. *Trends in genetics : TIG* 8, 55-61.
- Hashimoto, F., Horigome, T., Kanbayashi, M., Yoshida, K., and Sugano, H. (1983). An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal Biochem* 129, 192-199.
- Hay, R. (2010). Demodex and skin infection: fact or fiction. *Current opinion in infectious diseases* 23, 103-105.
- Heger, A., and Holm, L. (2000). Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. *Proteins* 41, 224-237.
- Henry, J., Hsu, C.Y., Haftek, M., Nachat, R., de Koning, H.D., Gardinal-Galera, I., Hitomi, K., Balica, S., Jean-Decoster, C., Schmitt, A.M., *et al.* (2011). Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 1567-1576.
- Henry, J., Toulza, E., Hsu, C.Y., Pellerin, L., Balica, S., Mazereeuw-Hautier, J., Paul, C., Serre, G., Jonca, N., and Simon, M. (2012). Update on the epidermal differentiation complex. *Frontiers in bioscience* 17, 1517-1532.
- Heukeshoven, J., and Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.

- Heukeshoven, J., and Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.
- Highley, K.R., Coomey, M., DenBeste, M., and Wolfram, L.J. (1977). Frictional properties of skin. *The Journal of investigative dermatology* 69, 303-305.
- Hitomi, K. (2005). Transglutaminases in skin epidermis. *European journal of dermatology : EJD* 15, 313-319.
- Hoffjan, S., and Stemmler, S. (2007). On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *The British journal of dermatology* 157, 441-449.
- Hoffner, G., van der Rest, G., Dansette, P.M., and Djian, P. (2009). The end product of transglutaminase crosslinking: simultaneous quantitation of [Nepsilon-(gamma-glutamyl) lysine] and lysine by HPLC-MS3. *Analytical biochemistry* 384, 296-304.
- Holland, K.T. (1993). Nutrition of cutaneous resident microorganisms. In *The Skin Microflora and Microbial Skin Disease*, W.C. Noble, ed. (Cambridge University Press), pp. 33-72.
- Holm, S.E., Tornqvist, I.O., and Cars, O. (1990). Paradoxical effects of antibiotics. *Scand J Infect Dis Suppl* 74, 113-117.
- Horenstein, M.G., and Simon, J. (2007). Investigation of the hair follicle inner root sheath in scarring and non-scarring alopecia. *Journal of cutaneous pathology* 34, 762-768.
- Houben, E., De Paepe, K., and Rogiers, V. (2007). A keratinocyte's course of life. *Skin pharmacology and physiology* 20, 122-132.
- Housby, J.N., Thorbjarnardottir, S.H., Jonsson, Z.O., and Southern, E.M. (2000). Optimised ligation of oligonucleotides by thermal ligases: comparison of *Thermus scotoductus* and *Rhodothermus marinus* DNA ligases to other thermophilic ligases. *Nucleic acids research* 28, E10.
- Hsu, C.Y., Henry, J., Raymond, A.A., Mechin, M.C., Pendaries, V., Nassar, D., Hansmann, B., Balica, S., Burlet-Schiltz, O., Schmitt, A.M., *et al.* (2011). Deimination of human filaggrin-2 promotes its proteolysis by calpain 1. *The Journal of biological chemistry* 286, 23222-23233.
- Huber, M., Siegenthaler, G., Mirancea, N., Marenholz, I., Nizetic, D., Breitkreutz, D., Mischke, D., and Hohl, D. (2005). Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. *The Journal of investigative dermatology* 124, 998-1007.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., *et al.* (2009). InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res* 37, D211-215.
- Hussain, S.H., Limthongkul, B., and Humphreys, T.R. (2013). The biomechanical properties of the skin. *Dermatol Surg* 39, 193-203.

- Iakoucheva, L.M., Kimzey, A.L., Masselon, C.D., Smith, R.D., Dunker, A.K., and Ackerman, E.J. (2001). Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA. *Protein science : a publication of the Protein Society* 10, 1353-1362.
- Imai, F.L., Uzawa, K., Nimura, Y., Moriya, T., Imai, M.A., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., and Tanzawa, H. (2005). Chromosome 1 open reading frame 10 (C1orf10) gene is frequently down-regulated and inhibits cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 1641-1655.
- Inoue, T., Tsujii, K., Okamoto, K., and Toda, K. (1986). Differential scanning calorimetric studies on the melting behavior of water in stratum corneum. *The Journal of investigative dermatology* 86, 689-693.
- Ishida-Yamamoto, A., Simon, M., Kishibe, M., Miyauchi, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., O'Brien, T.J., Serre, G., and Iizuka, H. (2004). Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *The Journal of investigative dermatology* 122, 1137-1144.
- Ishida, T., and Kinoshita, K. (2007). PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res* 35, W460-464.
- Ito, T., Meyer, K.C., Ito, N., and Paus, R. (2008). Immune privilege and the skin. *Current directions in autoimmunity* 10, 27-52.
- Kalinin, A., Marekov, L.N., and Steinert, P.M. (2001). Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *Journal of cell science* 114, 3069-3070.
- Kam, E., Resing, K.A., Lim, S.K., and Dale, B.A. (1993). Identification of rat epidermal profilaggrin phosphatase as a member of the protein phosphatase 2A family. *Journal of cell science* 106 (Pt 1), 219-226.
- Kamata, Y., Taniguchi, A., Yamamoto, M., Nomura, J., Ishihara, K., Takahara, H., Hibino, T., and Takeda, A. (2009). Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids. *The Journal of biological chemistry* 284, 12829-12836.
- Kang, D., Gho, Y.S., Suh, M., and Kang, C. (2002). Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* 23, 2.
- Kim, S.H., Kim, S., Choi, H.I., Choi, Y.J., Lee, Y.S., Sohn, K.C., Lee, Y., Kim, C.D., Yoon, T.J., Lee, J.H., *et al.* (2010). Callus formation is associated with hyperproliferation and incomplete differentiation of keratinocytes, and increased expression of adhesion molecules. *The British journal of dermatology* 163, 495-501.
- Kirketerp-Møller, K., Zulkowski, K., and James, G. (2011). Chronic Wound Colonization, Infection, and Biofilms. In *Biofilm Infections*, T. Bjarnsholt, P.Ø. Jensen, C. Moser, and N. Høiby, eds. (Springer New York), pp. 11-24.

- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., and Collins, J.J. (2008). Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* 135, 679-690.
- Koziel, J., and Potempa, J. (2013). Protease-armed bacteria in the skin. *Cell and tissue research* 351, 325-337.
- Krieg, P., Schuppler, M., Koesters, R., Mincheva, A., Lichter, P., and Marks, F. (1997). Repetin (Rptn), a new member of the "fused gene" subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics* 43, 339-348.
- Kumar, S., and Engelberg-Kulka, H. (2014). Quorum sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death as a novel class of antimicrobial agents. *Current opinion in microbiology* 21C, 22-27.
- Kypriotou, M., Huber, M., and Hohl, D. (2012). The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Experimental dermatology* 21, 643-649.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., and Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International journal of cosmetic science* 28, 359-370.
- Lange-Asschenfeldt, B., Marenbach, D., Lang, C., Patzelt, A., Ulrich, M., Maltusch, A., Terhorst, D., Stockfleth, E., Sterry, W., and Lademann, J. (2011). Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin. *Skin pharmacology and physiology* 24, 305-311.
- Lee, D.Y., Huang, C.M., Nakatsuji, T., Thiboutot, D., Kang, S.A., Monestier, M., and Gallo, R.L. (2009). Histone H4 is a major component of the antimicrobial action of human sebocytes. *The Journal of investigative dermatology* 129, 2489-2496.
- Lee, D.Y., Yamasaki, K., Rudsil, J., Zouboulis, C.C., Park, G.T., Yang, J.M., and Gallo, R.L. (2008). Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to kill propionibacterium acnes. *The Journal of investigative dermatology* 128, 1863-1866.
- Lee, I.H., Cho, Y., and Lehrer, R.I. (1997). Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and immunity* 65, 2898-2903.
- Lee, J., and Lee, D.G. (2015). Antimicrobial Peptides (AMPs) with Dual Mechanisms: Membrane Disruption and Apoptosis. *Journal of microbiology and biotechnology* 25, 759-764.
- Lee, S.C., Kim, I.G., Marekov, L.N., O'Keefe, E.J., Parry, D.A., and Steinert, P.M. (1993). The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *The Journal of biological chemistry* 268, 12164-12176.

- Lee, W.S. (2011). Integral hair lipid in human hair follicle. *Journal of dermatological science* *64*, 153-158.
- Lee, Y.J., Rice, R.H., and Lee, Y.M. (2006). Proteome analysis of human hair shaft: from protein identification to posttranslational modification. *Molecular & cellular proteomics* : MCP *5*, 789-800.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery* *12*, 371-387.
- Liew, O.W., Ching Chong, J.P., Yandle, T.G., and Brennan, S.O. (2005). Preparation of recombinant thioredoxin fused N-terminal proCNP: Analysis of enterokinase cleavage products reveals new enterokinase cleavage sites. *Protein expression and purification* *41*, 332-340.
- Lin, H.H., and Tseng, L.Y. (2010). DBCP: a web server for disulfide bonding connectivity pattern prediction without the prior knowledge of the bonding state of cysteines. *Nucleic acids research* *38*, W503-507.
- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., and Russell, R.B. (2003a). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* *11*, 1453-1459.
- Linding, R., Russell, R.B., Neduva, V., and Gibson, T.J. (2003b). GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res* *31*, 3701-3708.
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P., and Declercq, W. (2009). Cell death in the skin. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* *14*, 549-569.
- List, K., Szabo, R., Wertz, P.W., Segre, J., Haudenschild, C.C., Kim, S.Y., and Bugge, T.H. (2003). Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *The Journal of cell biology* *163*, 901-910.
- Little, T.J., Nelson, L., and Hupp, T. (2007). Adaptive evolution of a stress response protein. *PloS one* *2*, e1003.
- Lobritz, M.A., Belenky, P., Porter, C.B., Gutierrez, A., Yang, J.H., Schwarz, E.G., Dwyer, D.J., Khalil, A.S., and Collins, J.J. (2015). Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 8173-8180.
- Lonsdale-Eccles, J.D., Resing, K.A., Meek, R.L., and Dale, B.A. (1984). High-molecular-weight precursor of epidermal filaggrin and hypothesis for its tandem repeating structure. *Biochemistry* *23*, 1239-1245.
- Lonsdale-Eccles, J.D., Teller, D.C., and Dale, B.A. (1982). Characterization of a phosphorylated form of the intermediate filament-aggregating protein filaggrin. *Biochemistry* *21*, 5940-5948.
- Lothrop, A.P., Torres, M.P., and Fuchs, S.M. (2013). Deciphering post-translational modification codes. *FEBS letters* *587*, 1247-1257.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* *193*, 265-275.
- Lukacs, A. (1992). In-Vitro Control of the Growth of Important Bacteria of the Resident Skin Flora by Changes in pH. In *Skin Cleansing with Synthetic Detergents*, O. Braun-Falco, and H. Korting, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 97-105.
- Lundbald, R.L. (2005). The Modification of Histidine Residues. In *Chemical reagents for protein modification* (CRC Press).
- MacKay, B.J., Denepitiya, L., Iacono, V.J., Krost, S.B., and Pollock, J.J. (1984). Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity* *44*, 695-701.
- Madison, K.C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *The Journal of investigative dermatology* *121*, 231-241.
- Makino, T., Takaishi, M., Morohashi, M., and Huh, N.H. (2001). Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *The Journal of biological chemistry* *276*, 47445-47452.
- Makino, T., Takaishi, M., Toyoda, M., Morohashi, M., and Huh, N.H. (2003). Expression of hornerin in stratified squamous epithelium in the mouse: a comparative analysis with profilaggrin. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* *51*, 485-492.
- Makino, T., Yamakoshi, T., Mizawa, M., and Shimizu, T. (2014). Ultraviolet B irradiation induces the expression of hornerin in xenotransplanted human skin. *Acta histochemica* *116*, 20-24.
- Manabe, M., and O'Guin, W.M. (1992). Keratohyalin, trichohyalin and keratohyalin-trichohyalin hybrid granules: an overview. *The Journal of dermatology* *19*, 749-755.
- Marenholz, I., Zirra, M., Fischer, D.F., Backendorf, C., Ziegler, A., and Mischke, D. (2001). Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library. *Genome research* *11*, 341-355.
- Markova, N.G., Marekov, L.N., Chipev, C.C., Gan, S.Q., Idler, W.W., and Steinert, P.M. (1993). Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Molecular and cellular biology* *13*, 613-625.
- Mathieu, A., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2014). The future of skin metagenomics. *Research in microbiology* *165*, 69-76.
- Mauro, T.M., and Goldsmith, L.A. (2008). Biology of Eccrine, Apocrine, and Apoeccrine Sweat Glands. In *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, L.A.G. Klaus Wolff, Stephen E. Katz, Barbara A. Gilchrest, Amy S. Paller, David J. Leffell, ed. (McGraw-Hill), pp. 713-720.

McGrath, J.A., and Uitto, J. (2010). Anatomy and Organization of Human Skin. In Rooks Textbook of Dermatology, S.B. Tony Burns, Neil Cox, Christopher Griffiths, ed. (John Wiley & Sons Ltd), pp. 3.1-3.53.

McGuffin, L.J. (2008). Intrinsic disorder prediction from the analysis of multiple protein fold recognition models. *Bioinformatics* 24, 1798-1804.

Mechin, M.C., Enji, M., Nachat, R., Chavanas, S., Charveron, M., Ishida-Yamamoto, A., Serre, G., Takahara, H., and Simon, M. (2005). The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 1984-1995.

Menon, G.K., Cleary, G.W., and Lane, M.E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International journal of pharmaceutics* 435, 3-9.

Menon, G.K., Grayson, S., and Elias, P.M. (1985). Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *The Journal of investigative dermatology* 84, 508-512.

Metze, D., and Luger, T. (2001). Nervous system in the skin. In *The Biology of the Skin*, W.D.T. Freinkel R. K., ed. (Informa Healthcare), pp. 153-176.

Mischke, D., Korge, B.P., Marenholz, I., Volz, A., and Ziegler, A. (1996). Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *The Journal of investigative dermatology* 106, 989-992.

Moll, R., Divo, M., and Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology* 129, 705-733.

Montagna, W., Kligman, A.M., and Carlisle, K.S. (1992). Atlas of normal human skin. In (New York: Springer Verlag), pp. 225-300.

Mor, A. (2009). Multifunctional host defense peptides: antiparasitic activities. *The FEBS journal* 276, 6474-6482.

Moretti, S., Armougom, F., Wallace, I.M., Higgins, D.G., Jongeneel, C.V., and Notredame, C. (2007). The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic acids research* 35, W645-648.

Morioka, K. (2005). Hair follicle : differentiation under electron microscope : an atlas (Tokyo ; New York: Springer).

Murad, W., and Singh, R. (2013). The MS2DB ++ webserver: disulfide bond determination through evidence combination. *IEEE Trans Nanobioscience* 12, 340-342.

Murphy, K.P. (2012). *Janeway's immunobiology* (Garland Science).

Nachat, R., Mechin, M.C., Takahara, H., Chavanas, S., Charveron, M., Serre, G., and Simon, M. (2005). Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved

in the deimination of K1 and filaggrin. *The Journal of investigative dermatology* 124, 384-393.

Naghmouchi, K., Le Lay, C., Baah, J., and Drider, D. (2012). Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. *Research in microbiology* 163, 101-108.

Nakamura, A., Arimoto, M., Takeuchi, K., and Fujii, T. (2002). A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biological & pharmaceutical bulletin* 25, 569-572.

Nakatsuji, T., Chiang, H.I., Jiang, S.B., Nagarajan, H., Zengler, K., and Gallo, R.L. (2013). The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nature communications* 4, 1431.

Nakatsuji, T., Kao, M.C., Zhang, L., Zouboulis, C.C., Gallo, R.L., and Huang, C.M. (2010). Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating beta-defensin-2 expression. *The Journal of investigative dermatology* 130, 985-994.

Nemes, Z., Marekov, L.N., Fesus, L., and Steinert, P.M. (1999). A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8402-8407.

Nemes, Z., Petrovski, G., and Fesus, L. (2005). Tools for the detection and quantitation of protein transglutamination. *Analytical biochemistry* 342, 1-10.

Nemes, Z., and Steinert, P.M. (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Experimental & molecular medicine* 31, 5-19.

Netzel-Arnett, S., Currie, B.M., Szabo, R., Lin, C.Y., Chen, L.M., Chai, K.X., Antalis, T.M., Bugge, T.H., and List, K. (2006). Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *The Journal of biological chemistry* 281, 32941-32945.

Newman, A.M., and Cooper, J.B. (2007). XSTREAM: a practical algorithm for identification and architecture modeling of tandem repeats in protein sequences. *BMC bioinformatics* 8, 382.

Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., Nagaoka, I., Okumura, K., and Ogawa, H. (2007). Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *The Journal of investigative dermatology* 127, 594-604.

Noble, J.E., Knight, A.E., Reason, A.J., Di Matola, A., and Bailey, M.J. (2007). A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. *Molecular biotechnology* 37, 99-111.

Nordahl, E.A., Rydengard, V., Nyberg, P., Nitsche, D.P., Morgelin, M., Malmsten, M., Bjorck, L., and Schmidtchen, A. (2004). Activation of the complement system generates antibacterial

- peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 16879-16884.
- Nuding, S., Frasn, T., Schaller, M., Stange, E.F., and Zabel, L.T. (2014). Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* *58*, 5719-5725.
- O'Guin, W.M., Sun, T.T., and Manabe, M. (1992). Interaction of trichohyalin with intermediate filaments: three immunologically defined stages of trichohyalin maturation. *The Journal of investigative dermatology* *98*, 24-32.
- O'Regan, G.M., and Irvine, A.D. (2008). The role of filaggrin loss-of-function mutations in atopic dermatitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology* *8*, 406-410.
- Ogawa, H., Miyazaki, H., and Kimura, M. (1971). Isolation and characterization of human skin lysozyme. *The Journal of investigative dermatology* *57*, 111-116.
- Olson, B.J., and Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Pharmacol Appendix 3*, 3A.
- Oppenheim, J.J., and Yang, D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current opinion in immunology* *17*, 359-365.
- Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* *121*, 321-349.
- Oudhoff, M.J., Blaauboer, M.E., Nazmi, K., Scheres, N., Bolscher, J.G., and Veerman, E.C. (2010). The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity. *Biological chemistry* *391*, 541-548.
- Parra, J.L., Paye, M., and Group, E. (2003). EEMCO guidance for the in vivo assessment of skin surface pH. *Skin pharmacology and applied skin physiology* *16*, 188-202.
- Paus, R., Christoph, T., and Muller-Rover, S. (1999). Immunology of the hair follicle: a short journey into terra incognita. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* *4*, 226-234.
- Paus, R., and Cotsarelis, G. (1999). The biology of hair follicles. *The New England journal of medicine* *341*, 491-497.
- Paus, R., Pekar, S., and Sundberg, J.P. (2008). *Biology of Hair and Nails In Dermatology*, J.L.J. Jean L Bologna, Ronald P Rapini, ed. (Mosby Elsevier).
- Pawar, H., Maharudraiah, J., Kashyap, M.K., Sharma, J., Srikanth, S.M., Choudhary, R., Chavan, S., Sathe, G., Manju, H.C., Kumar, K.V., *et al.* (2013). Downregulation of cornulin in esophageal squamous cell carcinoma. *Acta histochemica* *115*, 89-99.
- Pazgier, M., Hoover, D.M., Yang, D., Lu, W., and Lubkowski, J. (2006). Human beta-defensins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *63*, 1294-1313.

- Pearnton, D.J., Nirunsuksiri, W., Rehemtulla, A., Lewis, S.P., Presland, R.B., and Dale, B.A. (2001). Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Experimental dermatology* 10, 193-203.
- Pellerin, L., Henry, J., Hsu, C.Y., Balica, S., Jean-Decoster, C., Mechin, M.C., Hansmann, B., Rodriguez, E., Weindinger, S., Schmitt, A.M., *et al.* (2013). Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131, 1094-1102.
- Percival, S.L., Emanuel, C., Cutting, K.F., and Williams, D.W. (2012a). Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *International wound journal* 9, 14-32.
- Percival, S.L., Hill, K.E., Williams, D.W., Hooper, S.J., Thomas, D.W., and Costerton, J.W. (2012b). A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 20, 647-657.
- Pereira, H.A., Erdem, I., Pohl, J., and Spitznagel, J.K. (1993). Synthetic bactericidal peptide based on CAP37: a 37-kDa human neutrophil granule-associated cationic antimicrobial protein chemotactic for monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 4733-4737.
- Peroutka III, R.J., Orcutt, S.J., Strickler, J.E., and Butt, T.R. (2011). SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. *Methods in molecular biology* 705, 15-30.
- Pethe, K., Sequeira, P.C., Agarwalla, S., Rhee, K., Kuhen, K., Phong, W.Y., Patel, V., Beer, D., Walker, J.R., Duraiswamy, J., *et al.* (2010). A chemical genetic screen in *Mycobacterium tuberculosis* identifies carbon-source-dependent growth inhibitors devoid of in vivo efficacy. *Nature communications* 1, 57.
- Presland, R.B., Haydock, P.V., Fleckman, P., Nirunsuksiri, W., and Dale, B.A. (1992). Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *The Journal of biological chemistry* 267, 23772-23781.
- Pretzel, J., Mohring, F., Rahlfs, S., and Becker, K. (2013). Antiparasitic peptides. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 135, 157-192.
- Proctor, R.A., Kahl, B., von Eiff, C., Vaudaux, P.E., Lew, D.P., and Peters, G. (1998). Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 27 Suppl 1, S68-74.
- Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology* 17, 1063-1072.
- Rawlings, A.V., and Harding, C.R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic therapy* 17 Suppl 1, 43-48.

- Rawlings, A.V., and Voegeli, R. (2013). Stratum corneum proteases and dry skin conditions. *Cell and tissue research* 351, 217-235.
- Raymond, A.A., Mechin, M.C., Nachat, R., Toulza, E., Tazi-Ahnini, R., Serre, G., and Simon, M. (2007). Nine procaspases are expressed in normal human epidermis, but only caspase-14 is fully processed. *The British journal of dermatology* 156, 420-427.
- Reithmayer, K., Meyer, K.C., Kleditzsch, P., Tiede, S., Uppalapati, S.K., Gläser, R., Harder, J., Schröder, J.M., and Paus, R. (2009). Human hair follicle epithelium has an antimicrobial defence system that includes the inducible antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) and RNase 7. *The British journal of dermatology* 161, 78-89.
- Resing, K.A., al-Alawi, N., Blomquist, C., Fleckman, P., and Dale, B.A. (1993). Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of Ca²⁺ in the second stage. *The Journal of biological chemistry* 268, 25139-25145.
- Resing, K.A., Johnson, R.S., and Walsh, K.A. (1995). Mass spectrometric analysis of 21 phosphorylation sites in the internal repeat of rat profilaggrin, precursor of an intermediate filament associated protein. *Biochemistry* 34, 9477-9487.
- Rieg, S., Garbe, C., Sauer, B., Kalbacher, H., and Schitteck, B. (2004). Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. *The British journal of dermatology* 151, 534-539.
- Rothnagel, J.A., and Rogers, G.E. (1986). Trichohyalin, an intermediate filament-associated protein of the hair follicle. *The Journal of cell biology* 102, 1419-1429.
- Rozek, A., Friedrich, C.L., and Hancock, R.E. (2000). Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 39, 15765-15774.
- Safferling, K., Sutterlin, T., Westphal, K., Ernst, C., Breuhahn, K., James, M., Jager, D., Halama, N., and Grabe, N. (2013). Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models. *The Journal of cell biology* 203, 691-709.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Korner, C., Tossi, A., Novikova, N., Shamova, O., and Sahl, H.G. (2010). Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. *Infection and immunity* 78, 2793-2800.
- Sato, K., Leidal, R., and Sato, F. (1987). Morphology and development of an apoeccrine sweat gland in human axillae. *The American journal of physiology* 252, R166-180.
- Schaaij-Visser, T.B., Bremmer, J.F., Braakhuis, B.J., Heck, A.J., Slijper, M., van der Waal, I., and Brakenhoff, R.H. (2010). Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of

dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. *Oral oncology* 46, 123-127.

Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* 166, 368-379.

Schaller, M., and Plewig, G. (2008). Structure and Function of Eccrine, Apocrine, Apoeccrine and Sebaceous Glands In *Dermatology*, J.L.J. Jean L Bolognia, Ronald P Rapini, ed. (Mosby Elsevier).

Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., *et al.* (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature immunology* 2, 1133-1137.

Schmid-Wendtner, M.H., and Korting, H.C. (2006). The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin pharmacology and physiology* 19, 296-302.

Schmidtchen, A., Pasupuleti, M., and Malmsten, M. (2014). Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. *Advances in colloid and interface science* 205, 265-274.

Schneider, M.R., Schmidt-Ullrich, R., and Paus, R. (2009). The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Current biology : CB* 19, R132-142.

Schröder, B.O., Ehmann, D., Precht, J.C., Castillo, P.A., Kuchler, R., Berger, J., Schaller, M., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2014). Paneth cell alpha-defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide. *Mucosal immunology*.

Schröder, B.O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2011). Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* 469, 419-423.

Schröder, J.M. (1999). Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical pharmacology* 57, 121-134.

Schröder, J.M., and Harder, J. (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 469-486.

Schröder, R., Waldsich, C., and Wank, H. (2000). Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *The EMBO journal* 19, 1-9.

Segre, J. (2003). Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier. *Current opinion in cell biology* 15, 776-782.

Senshu, T., Kan, S., Ogawa, H., Manabe, M., and Asaga, H. (1996). Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochemical and biophysical research communications* 225, 712-719.

Shapiro, A.L., Vinuela, E., and Maizel, J.V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28, 815-820.

- Shimizu, K., Muraoka, Y., Hirose, S., Tomii, K., and Noguchi, T. (2007). Predicting mostly disordered proteins by using structure-unknown protein data. *BMC bioinformatics* 8, 78.
- Shimoda, M., Ohki, K., Shimamoto, Y., and Kohashi, O. (1995). Morphology of defensin-treated *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity* 63, 2886-2891.
- Shimomura, Y., and Ito, M. (2005). Human hair keratin-associated proteins. The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research 10, 230-233.
- Shinnar, A.E., Butler, K.L., and Park, H.J. (2003). Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. *Bioorg Chem* 31, 425-436.
- Singer, A.J., and Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine* 341, 738-746.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., and Kent, R.L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology* 25, 134-144.
- Soding, J., Remmert, M., and Biegert, A. (2006). HHrep: de novo protein repeat detection and the origin of TIM barrels. *Nucleic Acids Res* 34, W137-142.
- Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H.G., Peschel, A., Gotz, F., Garbe, C., and Schitteck, B. (2006). Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2608-2620.
- Steinberg, D.A., and Lehrer, R.I. (1997). Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory. *Methods in molecular biology* 78, 169-186.
- Steinert, P.M., Cantieri, J.S., Teller, D.C., Lonsdale-Eccles, J.D., and Dale, B.A. (1981). Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 4097-4101.
- Steinert, P.M., Mack, J.W., Korge, B.P., Gan, S.Q., Haynes, S.R., and Steven, A.C. (1991). Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins. *International journal of biological macromolecules* 13, 130-139.
- Steinert, P.M., Parry, D.A., and Marekov, L.N. (2003). Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root sheath. *The Journal of biological chemistry* 278, 41409-41419.
- Steven, A.C., Bisher, M.E., Roop, D.R., and Steinert, P.M. (1990). Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *Journal of structural biology* 104, 150-162.

- Strug, I., Utzat, C., Cappione, A., 3rd, Gutierrez, S., Amara, R., Lento, J., Capito, F., Skudas, R., Chernokalskaya, E., and Nadler, T. (2014). Development of a univariate membrane-based mid-infrared method for protein quantitation and total lipid content analysis of biological samples. *J Anal Methods Chem* 2014, 657079.
- Suskiewicz, M.J., Sussman, J.L., Silman, I., and Shaul, Y. (2011). Context-dependent resistance to proteolysis of intrinsically disordered proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society* 20, 1285-1297.
- Szklarczyk, R., and Heringa, J. (2004). Tracking repeats using significance and transitivity. *Bioinformatics* 20 Suppl 1, i311-317.
- Takahashi, H., Aoki, N., Nakamura, S., Asano, K., Ishida-Yamamoto, A., and Iizuka, H. (2000). Cornified cell envelope formation is distinct from apoptosis in epidermal keratinocytes. *Journal of dermatological science* 23, 161-169.
- Takaishi, M., Makino, T., Morohashi, M., and Huh, N.H. (2005). Identification of human hornerin and its expression in regenerating and psoriatic skin. *The Journal of biological chemistry* 280, 4696-4703.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28, 2731-2739.
- Tanouchi, Y., Lee, A.J., Meredith, H., and You, L. (2013). Programmed cell death in bacteria and implications for antibiotic therapy. *Trends in microbiology* 21, 265-270.
- Tantos, A., Szrnka, K., Szabo, B., Bokor, M., Kamasa, P., Matus, P., Bekesi, A., Tompa, K., Han, K.H., and Tompa, P. (2013). Structural disorder and local order of hNopp140. *Biochimica et biophysica acta* 1834, 342-350.
- Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (2000). Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102, 451-461.
- Territo, M.C., Ganz, T., Selsted, M.E., and Lehrer, R. (1989). Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 84, 2017-2020.
- Thibaut, S., Candi, E., Pietroni, V., Melino, G., Schmidt, R., and Bernard, B.A. (2005). Transglutaminase 5 expression in human hair follicle. *The Journal of investigative dermatology* 125, 581-585.
- Thibaut, S., Cavusoglu, N., de Becker, E., Zerbib, F., Bednarczyk, A., Schaeffer, C., van Dorsselaer, A., and Bernard, B.A. (2009). Transglutaminase-3 enzyme: a putative actor in human hair shaft scaffolding? *The Journal of investigative dermatology* 129, 449-459.
- Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends in biochemical sciences* 27, 527-533.
- Tompa, P. (2012a). Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends in biochemical sciences* 37, 509-516.

- Tompa, P. (2012b). Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends Biochem Sci* 37, 509-516.
- Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55, 4-30.
- Tosti, A., and Piraccini, B.A. (2008). Biology of Nails and Nail Disorders. In Fitzpatrick's *Dermatology in General Medicine*, L.A.G. Klaus Wolff, Stephen E. Katz, Barbara A. Gilchrest, Amy S. Paller, David J. Leffell, ed. (McGraw-Hill), pp. 778-794.
- Toulza, E., Mattiuzzo, N.R., Galliano, M.F., Jonca, N., Dossat, C., Jacob, D., de Daruvar, A., Wincker, P., Serre, G., and Guerrin, M. (2007). Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome biology* 8, R107.
- Travis, S.M., Anderson, N.N., Forsyth, W.R., Espiritu, C., Conway, B.D., Greenberg, E.P., McCray, P.B., Jr., Lehrer, R.I., Welsh, M.J., and Tack, B.F. (2000). Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infection and immunity* 68, 2748-2755.
- UniProt, C. (2012). Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic acids research* 40, D71-75.
- Uversky, V.N., Gillespie, J.R., and Fink, A.L. (2000). Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 41, 415-427.
- Vallejo, A.N., Pogulis, R.J., and Pease, L.R. (1994a). In vitro synthesis of novel genes: mutagenesis and recombination by PCR. *Genome research* 4, S123-S130.
- Vallejo, A.N., Pogulis, R.J., and Pease, L.R. (1994b). In vitro synthesis of novel genes: mutagenesis and recombination by PCR. *PCR Methods Appl* 4, S123-130.
- van den Bogaard, E.H., Bergboer, J.G., Vonk-Bergers, M., van Vlijmen-Willems, I.M., Hato, S.V., van der Valk, P.G., Schroder, J.M., Joosten, I., Zeeuwen, P.L., and Schalkwijk, J. (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation* 123, 917-927.
- Vilella, A.J., Severin, J., Ureta-Vidal, A., Heng, L., Durbin, R., and Birney, E. (2009). EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Res* 19, 327-335.
- Vogel, H. (1981). Incorporation of melittin into phosphatidylcholine bilayers. Study of binding and conformational changes. *FEBS letters* 134, 37-42.
- Vogt, A., Hadam, S., Heiderhoff, M., Audring, H., Lademann, J., Sterry, W., and Blume-Peytavi, U. (2007). Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Experimental dermatology* 16, 946-950.
- Vogt, A., McElwee, K.J., and Blume-Peytavi, U. (2008). Biology of the Hair Follicle. In *Hair Growth and Disorders* (Berlin: Springer), p. 23.

- Volz, A., Korge, B.P., Compton, J.G., Ziegler, A., Steinert, P.M., and Mischke, D. (1993). Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics* 18, 92-99.
- Wang, G. (2014). Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals* 7, 545-594.
- Wang, G. (2015). Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods in molecular biology* 1268, 43-66.
- Wang, G., Li, X., and Wang, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic acids research* 37, D933-937.
- Wang, L., Wang, Y.Y., Cao, Q., Chen, Z., and Chen, S.J. (2006). Hornerin gene was involved in a case of acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndrome with t(1;2)(q21;q37). *Leukemia* 20, 2184-2187.
- Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F., and Jones, D.T. (2004). Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* 337, 635-645.
- Warner, R.R., Myers, M.C., and Taylor, D.A. (1988). Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. *The Journal of investigative dermatology* 90, 218-224.
- Weerheim, A., and Ponc, M. (2001). Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Archives of dermatological research* 293, 191-199.
- Wheeler, D.L., Barrett, T., Benson, D.A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., Dicuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., *et al.* (2008). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research* 36, D13-21.
- Wildeman, E., and Pires, M.M. (2013). Facile fluorescence-based detection of PAD4-mediated citrullination. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 14, 963-967.
- Wilke, K., Martin, A., Terstegen, L., and Biel, S.S. (2007). A short history of sweat gland biology. *International journal of cosmetic science* 29, 169-179.
- Wilmes, M., and Sahl, H.G. (2014). Defensin-based anti-infective strategies. *International journal of medical microbiology : IJMM* 304, 93-99.
- Wolf, B., Lesnaw, J.A., and Reichmann, M.E. (1970). A mechanism of the irreversible inactivation of bovine pancreatic ribonuclease by diethylpyrocarbonate. A general reaction of diethylpyrocarbonate . A general reaction of diethylpyrocarbonate with proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 13, 519-525.
- Woodley, D.T., and Chen, M. (2001). The basement membrane zone. In *The biology of the skin*, R.K. Freinkel, and D.T. Woodley, eds., pp. 133-152.

- Wu, Z. (2005). Analysis of two human gene clusters involved in innate immunity. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät (Kiel: Christan-Albrechts-Universität), pp. 126.
- Wu, Z., Hansmann, B., Meyer-Hoffert, U., Gläser, R., and Schröder, J.M. (2009a). Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PloS one* 4, e5227.
- Wu, Z., Latendorf, T., Meyer-Hoffert, U., and Schröder, J.M. (2011). Identification of trichohyalin-like 1, an s100 fused-type protein selectively expressed in hair follicles. *The Journal of investigative dermatology* 131, 1761-1763.
- Wu, Z., Meyer-Hoffert, U., Reithmayer, K., Paus, R., Hansmann, B., He, Y., Bartels, J., Gläser, R., Harder, J., and Schröder, J.M. (2009b). Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin. *The Journal of investigative dermatology* 129, 1446-1458.
- Xu, Z., Wang, M.R., Xu, X., Cai, Y., Han, Y.L., Wu, K.M., Wang, J., Chen, B.S., Wang, X.Q., and Wu, M. (2000). Novel human esophagus-specific gene c1orf10: cDNA cloning, gene structure, and frequent loss of expression in esophageal cancer. *Genomics* 69, 322-330.
- Ya-Xian, Z., Suetake, T., and Tagami, H. (1999). Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Archives of dermatological research* 291, 555-559.
- Yagui-Beltran, A., Craig, A.L., Lawrie, L., Thompson, D., Pospisilova, S., Johnston, D., Kernohan, N., Hopwood, D., Dillon, J.F., and Hupp, T.R. (2001). The human oesophageal squamous epithelium exhibits a novel type of heat shock protein response. *European journal of biochemistry / FEBS* 268, 5343-5355.
- Yamaguchi, Y., Park, J.H., and Inouye, M. (2011). Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annual review of genetics* 45, 61-79.
- Yamamoto-Tanaka, M., Makino, T., Motoyama, A., Miyai, M., Tsuboi, R., and Hibino, T. (2014). Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation. *Cell death & disease* 5, e1181.
- Yamazaki, M., Ishidoh, K., Suga, Y., Saido, T.C., Kawashima, S., Suzuki, K., Kominami, E., and Ogawa, H. (1997). Cytoplasmic processing of human profilaggrin by active mu-calpain. *Biochemical and biophysical research communications* 235, 652-656.
- Yeaman, M.R., and Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews* 55, 27-55.
- Ying, S., Dong, S., Kawada, A., Kojima, T., Chavanas, S., Mechin, M.C., Adoue, V., Serre, G., Simon, M., and Takahara, H. (2009). Transcriptional regulation of peptidylarginine deiminase expression in human keratinocytes. *Journal of dermatological science* 53, 2-9.

- Yoneda, K., Akiyama, M., Morita, K., Shimizu, H., Imamura, S., and Kim, S.Y. (1998). Expression of transglutaminase 1 in human hair follicles, sebaceous glands and sweat glands. *The British journal of dermatology* 138, 37-44.
- Zeeuwen, P.L. (2004). Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *European journal of cell biology* 83, 761-773.
- Zeeuwen, P.L., Boekhorst, J., van den Bogaard, E.H., de Koning, H.D., van de Kerkhof, P.M., Saulnier, D.M., van, S., Il, van Hijum, S.A., Kleerebezem, M., Schalkwijk, J., *et al.* (2012). Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption. *Genome biology* 13, R101.
- Zhang, W., Chen, X., Luo, A., Lin, D., Tan, W., and Liu, Z. (2009). Genetic variants of C1orf10 and risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer science* 100, 1695-1700.
- Zhao, X., Wu, H., Lu, H., Li, G., and Huang, Q. (2013). LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PloS one* 8, e66557.
- Zhao, Y., and Jensen, O.N. (2009). Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 9, 4632-4641.
- Zuo, X., Li, S., Hall, J., Mattern, M.R., Tran, H., Shoo, J., Tan, R., Weiss, S.R., and Butt, T.R. (2005). Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *Journal of structural and functional genomics* 6, 103-111.

11 Danksagung

Diese Dissertation wäre niemals ohne die Unterstützung sehr vieler hilfsbereiter Menschen entstanden. Ich danke allen Mitarbeitern der Hautklinik die mir unterstützend zur Seite gestanden haben. Bei einigen Personen möchte ich mich besonders bedanken.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Jens-Michael Schröder für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe. In den Diskussionen mit dir habe ich viel gelernt. Vor allem das ständige infrage stellen von „Wissen“ und die Aufgeschlossenheit neuem gegenüber haben mich sehr inspiriert. „Wie wahrscheinlich ist es heute drei Sechser mit Zusatzzahl im Lotto zu haben?“ Die aus den Diskussionen hervorgegangene Anzahl neuer Ideen/ Thesen stand leider immer in einem Missverhältnis zu den Möglichkeiten der Überprüfung dieser Ideen/ Thesen. Da ist bestimmt noch Arbeit für die nächsten 50 Jahre vorhanden.

Für die unkomplizierte und freundliche Übernahme des Gutachtens danke ich Prof. Dr. Matthias Leippe.

Für die besondere Unterstützung bei der HPLC, den Gelelektrophoresen und den mikrobiologischen Arbeiten danke ich Jutta (was reparieren wir als nächstes?), Claudia (wann Treffen wir uns alle im Haus der Familie zum Kochen?), Anke (die nächste EM, WM kommt bestimmt!) und Marlies (Treffen im Eidertal?), ihr standet mir bei jeglicher Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank.

Für die Unterstützung bei den antimikrobiellen Tests gilt mein ganz besonderer Dank Silvia (wann sehe ich dich mal wieder beim Radeln?).

Für die Hilfe bei der Immunhistochemie danke ich besonders Christel und Sandra.

Für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor danke ich Manfred, Jihad, Elvira (erklär mal genau), Doris (Qualitätssicherung!!!), Heilwig (Torte für Reparatur), Conny (B. und eine Frage von reinem Geschmack), Maren, Bente, Franzi, Lena, Felix, Rüdiger, Kerstin, Graziella (die Immu-Derma-Biochem Achse), Claudia N. (Toyota Corolla for ever) und Nina (einmal Roller ohne Alles).

Auch wenn wir nicht direkt im selben Labor gearbeitet haben so möchte ich mich bei Karina, Björn, Astrid, Maria, Nancy, Anselm, Felix und allen anderen Mitarbeitern der AG Reiss für die Laborstammtische und sonstige gemeinsame Festivitäten bedanken. Sie waren immer eine Bereicherung unseres Laboralltags.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Tholey, Dr. Dennis Linke, Prasath Somasundaram und Dr. Liam Cassidy sowie natürlich Martin Winter danke ich für die tolle Zusammenarbeit am Imaging-MS.

Dr. Sascha Jung und Tim Kerkow aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Grötzinger danke ich für die Hilfe bei der Aufnahme der CD-Spektren.

Dr. Maria Mulisch, Marita Beese und Kay Kruse von der Zentralen Mikoskopie danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der vielen elektronenmikroskopischen Bilder.

Jürgen möchte ich für die stete Bereitschaft zur Diskussion danken.

Den cand. Dr. med Anne, Felix, Jomtje, Louis und Christina danke ich für die vielen interessanten medizinischen Diskussionen und Louis im Besonderen fürs radeln und den Butterkuchenbackwettbewerb.

Bei Julia, Ulf und Ole bedanke ich mich für die schönen Abende in Suchsdorf beim Grillen oder am Ofen mit tollem Essen und bei Thomasz für die Einführung in die Welt der Proteasen.

Mein besonderer Dank gilt Joachim, da man mit jedem massenspektrometrischen und administrativen/organisatorischen Problem bei dir ein offenes Ohr gefunden hat.

Für die kritische Durchsicht und hilfreichen Anregungen zu dieser Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Uli und besonders bei Britta. Der Spaß im Labor kam mit euch nie zu kurz und mit euch Wissenschaft zu machen war eine große Bereicherung.

Bei Zhihong bedanke ich mich für die Einführung in die „chinesische“ Wissenschaft (PCRs auf Banden, die man im Gel nicht sieht, kannte ich noch nicht) und für die vielen Diskussionen über europäische und asiatische Ansichten.

Ein ganz besonderer Dank geht an Jan, vielen Dank für die super Gespräche in unserem Büro. Ich finde wir waren ein echt gutes Team! Danke.

Ihr alle zusammen habt mich nie den Spaß an meiner Arbeit verlieren lassen.

Meiner Familie danke ich, dass sie mir alle Möglichkeiten eröffnet haben, meine Interessen zu verfolgen und mir dabei jegliche Unterstützung gewährt haben.

Von ganzem Herzen danke ich Kirstin. Für Alles!

12 Lebenslauf

| | |
|----------------------------|----------------|
| Name | Ties Latendorf |
| geboren am | 08.03.1977 |
| in | Preetz |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Hochschulausbildung

| | |
|-----------------------------|---|
| seit Juni 2007 | Promotion an der Klinik für Dermatologie des UKSH Campus Kiel in der klinischen Forschergruppe von Prof. Dr. Jens-Michael Schröder |
| 2007 - 2009 | Mitarbeiter im Teilprojekt A02 „Untersuchungen zur Rolle neuer antimikrobieller Peptide der menschlichen Haut“ des Sonderforschungsbereichs SFB 617 „Molekulare Mechanismen der epithelialen Abwehr“ |
| seit 2010 | Mitarbeiter im Reinhard-Kosellek-Projekt „Resistenz-vermeidende antibiotische Abwehrprinzipien der gesunden Haut“ zugunsten von Prof. Dr. Jens-Michael Schröder |
| seit 2011 | Beteiligung am Aufbau einer MALDI Imaging-MS Einheit „Evaluation and validation of MALDI-IMS in molecular pathology“ im Zuge einer DFG Großgeräteinitiative |
| Okt. 2006 - Mai 2007 | Diplomarbeit am Institut für Immunologie des UKSH Campus Kiel in der Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie von Prof. Dr. Ottmar Janßen „Proteom-Analyse von Allergenen unterschiedlicher Erdnussvarietäten“ |
| 1999 - 2007 | Studium der Biochemie/ Molekularbiologie, CAU Kiel Hauptfächer: Biochemie/ Molekularbiologie und Immunologie Nebenfächer: pharmazeutische Chemie und Mikrobiologie |
| 1998 - 1999 | Studium der Humanmedizin, CAU Kiel |

Berufsausbildung

| | |
|------------------------------|---|
| seit Okt. 1998 | Rettungsassistent in Teilzeit im Rettungsdienst des Kreises Plön |
| Jan. 1998 – Sep. 1998 | Ausbildung zum Rettungsassistenten |
| Dez. 1996 – Dez. 1997 | Zivildienst im Rettungsdienst des Kreises Plön - Ausbildung zum Rettungssanitäter |

Schulausbildung

| | |
|---------------------|--|
| 29. Mai 1996 | Abitur, Leistungskurse: Ernährungslehre mit Chemie und Biologie |
| 1993 - 1996 | Fachgymnasium - sozialwirtschaftlicher Zweig, Preetz |
| 1987 - 1993 | Realschule, Preetz |
| 1983 - 1987 | Grundschule, Preetz |

13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Sie hat weder ganz, noch zum Teil an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Sie wurde, abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht. Sie ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, 01.09.2015

Ties Latendorf

14 Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit

Poster

WU, Z., **LATENDORF, T.**, HINRICHSSEN, K., SCHROEDER, J.-M., 2009. New insights into skin evolution: positive selection of the S100-fused-typeprotein (SFTP) gene family. *Experimental Dermatology*, 18, 3, 322

WU, Z., **LATENDORF, T.**, MEYER-HOFFERT, U., HANSMANN, B., SCHROEDER, J.-M., 2010. Trichohyalin-like 1, a novel member of the S100 fused-type protein family. *Experimental Dermatology*, 19, 2, 215

WU, Z., **LATENDORF, T.**, MEYER-HOFFERT, U., HANSMANN, B., SCHROEDER, J.-M., 2010. Trichohyalin-like 1, a novel human hair follicle-specific S100 fused-type protein. *Journal of Investigative Dermatology*, 130, S2, S91

BEHRENDT, F., HARTMANN, J., BABIAN, S., KARSCH, D., SCHULZ, C., **LATENDORF, T.**, HANSMANN, B., WU, Z., SCHROEDER, J.-M., 2010. Profilaggrin constitutively provides a basal antimicrobial reservoir for the skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 130, S2, S32

FISCHER, J., **LATENDORF, T.**, MEYER-HOFFERT, U., 2011. Transglutamination of SPINK6: cross-linked regulation of protease activity in the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 131, S2, S57

JUNGE, A.-K., **LATENDORF, T.**, HANSMANN, B., SCHROEDER, J.-M., 2011. Filaggrin-2 B-type repeats exhibit different antimicrobial activity. *Journal of Investigative Dermatology*, 131, S2, S56

FROESEWITTE, L., **LATENDORF, T.**, HANSMANN, B., GERSTEL, U., SCHROEDER, J.-M., 2012. Is loricrin a Trojan Horse antimicrobial peptide mimicking a bacterial microcin B17 precursor? *Experimental Dermatology*, 21, 3, E10

FISCHER, J., KOBLYAKOVA, Y., **LATENDORF, T.**, WU, Z., MEYER-HOFFERT, U., 2012. Cross-linked regulation of protease activity in the epidermis by transglutaminated SPINK6. *Experimental Dermatology*, 21, 3, E5

SCHROEDER, J.-M., WU, Z., HANSMANN, B., **LATENDORF, T.**, BARTELS, J., 2012. The stratum corneum is a rich source of human antimicrobial peptides. *International Journal of Cosmetic Science*, 34, 4, 382

MERCIER, D., **LATENDORF, T.**, FOELSTER-HOLST, R., SCHROEDER, J.-M., MEYER-HOFFERT, U., 2014. Immunohistochemical studies on hornerin in inflammatory skin diseases. *Experimental Dermatology*, 23, 3, E20

BLANKENBURG, K., HANSMANN, B., **LATENDORF, T.**, SCHROEDER, J.-M., GERSTEL, U., 2014. Protein fragments of the S100 fused-type Proteins Filaggrin-2 and Hornerin modulate keratinocyte responses *Journal of Investigative Dermatology*, 134, S2, S49

Artikel

KANTYKA, T., **LATENDORF, T.**, WIEDOW, O., BARTELS, J., GLAESER, R., DUBIN, G., SCHROEDER, J.-M., POTEMPA, J., MEYER-HOFFERT, U., 2009. Elafin is specifically inactivated by RgpB from *Porphyromonas gingivalis* by distinct proteolytic cleavage. *Biological Chemistry*, 390, 12, 1313-1320

MEYER-HOFFERT, U., WU, Z., KANTYKA, T., FISCHER, J., **LATENDORF, T.**, HANSMANN, B., BARTELS, J., HE, Y., GLAESER, R., SCHROEDER, J.-M., 2010. Isolation of SPINK6 in Human Skin SELECTIVE INHIBITOR OF KALLIKREIN-RELATED PEPTIDASES. The Journal of biological chemistry, 285, 42, 32174-32181

WU, Z., **LATENDORF, T.**, MEYER-HOFFERT, U., SCHROEDER, J.-M., 2011. Identification of Trichohyalin-Like 1, an S100 Fused-Type Protein Selectively Expressed in Hair Follicles. Journal of Investigative Dermatology, 131, 8, 1761-1763

FISCHER, J., KOBLYAKOVA, Y., **LATENDORF, T.**, WU, Z., MEYER-HOFFERT, U., 2013. Cross-Linking of SPINK6 by Transglutaminases Protects from Epidermal Proteases. Journal of Investigative Dermatology, 133, 5, 1170-1177

